

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

IVAN PREPELUH

**REZISTENCIJA VIRUSA LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE
TIPA 1 NA INHIBITORE INTEGRAZE**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

IVAN PREPELUH

**REZISTENCIJA VIRUSA LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE
TIPA 1 NA INHIBITORE INTEGRAZE**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je izrađen u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Snježane Židovec-Lepej, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Snježani Židovec-Lepej na savjetima, razumijevanju, pomoći, ali i velikoj podršci tijekom pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se dr.sc. Ani Planinić, s kojom sam radio eksperimentalni dio ovog istraživanja, na pružanoj pomoći u bilo kojem trenutku tijekom pisanja ovog rada.

Najviše se zahvaljujem svojoj mami koja mi je bila najveća podrška tijekom studiranja, na pruženoj pažnji, strpljenju i ljubavi.

Hvala i ostatku moje obitelji, ponajprije baki i teti na pruženoj podršci tijekom studiranja.

Hvala mojoj kumici Ireni za pruženu pomoć tijekom studiranja

Hvala i svim mojim dragim prijateljima koji su bili uz mene cijelo vrijeme, a najviše mojoj Maji koja mi je dala snage u trenucima kada je nisam imao.

Zahvaljujem kolegici Maji Fabijanić na nagovoru da upišem ovaj studij.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

REZISTENCIJA VIRUSA LJUDSKE IMUNODEFICIJENCIJE TIPA 1 NA INHIBITORE INTEGRAZE

Ivan Prepeluh
Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati mutacije povezane s rezistencijom HIV-a tipa 1 na antiretrovirusne lijekove tj. inhibitore integraze, reverzne transkriptaze i proteaze u neliječenih osoba zaraženih HIV-om i usporediti ih s mutacijama koje se pojavljuju u bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja te usporediti interpretaciju biološke značajnosti detektiranih mutacija primjenom tri bioinformatička algoritma. Rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove određena je metodom populacijskog sekvenciranja regije *pol* genoma HIV-a. Primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove dokazane su u 2/20 (10%) neliječenih zaraženih osoba te u 6/20 (30%) neuspješno liječenih bolesnika. Primarne mutacije povezane s rezistencijom na inhibitore integraze (N155H i Q148R) koje uzrokuju križnu rezistenciju na raltegravir i dolutegravir detektirane su u dva liječena bolesnika. Rezistencija na nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze dokazana je u 4/11 (36,4%) liječenih bolesnika te u 2/19 (10,5%) neliječenih ispitanika. Primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-a na inhibitore proteaze nisu detektirane dok je primarna mutacija G140A, koja uzrokuje rezistenciju HIV-1 na nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze, pronađena kod jednog liječenog bolesnika. Najčešća primarna mutacija detektirana u ovom istraživanju je bila M148V/I koja uzrokuje rezistenciju na nukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze. Ukupno 85% ispitanika bilo je zaraženo subtipom B HIV-a tipa 1. Rezultati ovog istraživanja prvi su dokaz rezistencije HIV-a na inhibitore integraze u Hrvatskoj. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove koje se pojavljuju u neliječenih i liječenih osoba su različite, a postoje nesukladnosti pri interpretaciji njihove biološke značajnosti obzirom na različite bioinformatičke algoritme.

(66 stranica, 27 slika, 14 tablica, 49 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HIV-1, rezistencija, antiretrovirusni lijekovi, integraza
Voditelj: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent
Ocjenitelji: dr. sc. Snježana Židovec-Lepej, docent
dr. sc. Domagoj Đikić, izvanredni profesor
dr. sc. Marin Ježić, docent

Rad prihvaćen: 03.03.2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

RESISTANCE OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 TO INTEGRASE INHIBITORS

Ivan Prepeluh
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb

The main goal of this experiment was to analyze mutations associated with resistance of HIV type 1 to antiretroviral drugs (integrase inhibitors, reverse transcriptase inhibitors and protease inhibitors) in treatment-naïve patients and compare them with mutations in treatment-experienced patients having virologic failure, and also compare interpretation of biological significance of these detected mutations with three bioinformatic algorithms. Resistance of HIV to antiretroviral drugs was detected by "populations-based" sequencing method of *pol* region of the HIV genome. Major mutations associated with HIV resistance to antiretroviral drugs were detected in 2/20 (10%) treatment naïve and in 6/20 (30%) patients having treatment failure. Major mutations associated with resistance to integrase inhibitors (N155H and Q148R) leading to cross-resistance between raltegravir and elvitegravir were detected in two treatment experienced patients. Resistance to nucleoside inhibitors of reverse transcriptase was detected in 4/11 (36,4%) treatment experienced patients and in 2/19 (10,5%) treatment naïve patients. Major mutations to protease inhibitors were not detected, while mutation G140A that causes HIV resistance to non- nucleoside inhibitors of reverse transcriptase was detected in one treatment experienced patient. The most common major mutation detected in this experiment was M148V/I that causes resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors. 85% of all patients were infected with HIV-1 subtype B. The results of this experiment are the first one in Croatia referring to HIV resistance to integrase inhibitors. Mutations associated with HIV resistance to antiretroviral drugs in treatment naïve and experienced patients are different, and there are also nonconformities with interpretation of their biological significance depending on different bioinformatics algorithms.

(66 pages, 27 figures, 14 tables, 49 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library

Keywords: HIV-1, resistance, antiretroviral drugs, integrase

Supervisor: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Reviewers: Snježana Židovec-Lepej, PhD, Assistant Professor

Domagoj Đikić, PhD, Associate. Professor

Marin Ježić, PhD, Assistant Professor

Thesis accepted: March 3, 2017.

POPIS KRATICA

3TC-lamivudin
ABC-abakavir
AIDS-engl. *Acquired immunodeficiency syndrome*; sindrom stečene imunodeficijencije
ANRS-fr. *Agence Nationale de Recherche sur le SIDA*; Francuska agencija za istraživanje
AIDS-a
ATV-atazanavir
CRF-engl. *Circulating recombinant form*; cirkulirajuća rekombinantna forma
d4T-stavudin
ddI-didanozin
DLV-delavirdin
DRV-darunavir
DTG-dolutegravir
EFV-efavirenz
EMA-engl. *European Medicines Agency*; Europska agencija za lijekove
ETV-etravirin
EVG-elvitegravir
FDA-engl. *US Food and Drug Administration*; Američka agencija za hranu i lijekove
FPV-fosamprenavir
FTC-emtricitabin
HAART-engl. *Highly active antiretroviral therapy*; vrlo djelotvorno antiretrovirusno liječenje
HIV-1-engl. *Human immunodeficiency virus type 1*; virus ljudske imunodeficijencije tipa 1
IAS-USA-engl. *International AIDS Society-USA*; američki ogranak međunarodnog društva za borbu protiv AIDS-a
IDV-indinavir
INSTI-engl. *Integrase strand transfer inhibitors*; inhibitori integraze
LAV engl. *Lymphadenopathy-associated virus*; virus udružen s limfadenopatijom
LPV-lopinavir
LTR-engl. *Long terminal repeat*; dugi ponavljajući krajevi
MVC-maravirok
NFV-nelfinavir
NNRTI-engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*; nenukleozidni inhibitor reverzne transkriptaze
NRTI/NtRTI-engl. *Nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor*; nukleozidni/nukleotidni inhibitor reverzne transkriptaze
NVP-nevirapin
PI-engl. *Protease inhibitor*, inhibitor proteaze
PR-proteaza
RAL-raltegravir
RPV-rilpivirin
RT-reverzna transkriptaza
RTV-ritonavir
SIV-engl. *Simian immunodeficiency virus*, virus imunodeficijencije majmuna
SQV-sakvinavir
T-20-enfuvirtid
TAF- tenofivir alafenamid
TAM-engl. *Thymidine analog resistance mutation*; mutacija povezana s rezistencijom na timidinske analoge
TDF-tenofovir

TPV-tipranavir

WT-engl. *Wild type*; divlji tip

UNAIDS - *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*; Zajednički program

Ujedinjenih naroda za HIV/AIDS

ZDV-zidovudin

Aminokiseline:

A-alanin

C-cistein

D-asparaginska kiselina

E-glutaminska kiselina

F-fenilalanin

G-glicin

H-histidin

I-izoleucin

K-lizin

L-leucin

M-metionin

N-asparagin

P-prolin

Q-glutamin

R-arginin

S-serin

T-treonin

V-valin

W-triptofan

Y-tirozin

Sadržaj	
1. UVOD	1
1.1. Virus ljudske imunodeficijencije	1
1.1.2. Genom virusa	2
1.1.3. Struktura i replikacijski ciklus HIV-1	3
1.1.4. Genska varijabilnost HIV-1	6
1.1.5. Imunopatogeneza HIV-1 infekcije	6
1.1.6. Klasifikacija HIV-1	7
1.1.7. Epidemiologija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj i ostatku svijeta	9
1.2. Antiretrovirusno liječenje	10
1.2.1. Inhibitori reverzne transkriptaze	11
1.2.2. Inhibitori proteaze	12
1.2.3. Inhibitori integraze	13
1.2.4. Inhibitori ulaska virusa u stanicu	15
1.3. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove	16
1.3.1. Rezistencija na nukleozidne i nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze	17
1.3.2. Rezistencija na nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze	18
1.3.3. Rezistencija na inhibitore proteaze	19
1.3.4. Rezistencija na inhibitore integraze	19
1.4. Laboratorijske metode za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE	23
3.1. Ispitanici	23
3.2. Biološki uzorc	23
3.3. Komercijalni paketi	23
3.4 Oprema i potrošni materijali	27
3.5 Metode	28
3.5.1. Izolacija HIV-1 RNA	28
3.5.2. Sekvenciranje gena <i>pol</i> HIV-1	28

3.5.2.1 Reverzna transkripcija	29
3.5.2.2 Lačana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction, PCR</i>)	30
3.5.2.3. Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-PCR)	30
3.5.2.4 Pročišćavanje i kvantifikacija RT-PCR i PCR produkta	31
3.5.2.5. Reakcija sekvenciranja	32
3.5.2.6. Pročišćavanje sekvenci	33
3.5.2.7. Detekcija i analiza sekvenci	34
3.5.3. Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove	34
3.5.4. Genotipizacija HIV-1	34
4. REZULTATI	35
4.1. Ispitanici	35
4.2. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove	36
4.2.1 Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NRTI	36
4.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NNRTI	38
4.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na PI	40
4.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na INSTI	41
4.3. Interpretacija rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove prema ViroSeq programskoj podršci	42
4.4 Interpretacija i usporedba genotipske rezistencije HIV-1 prema algoritmima ANRS, Stanford HIVdb i Rega	43
4.5. Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na Antiretrovirusne lijekove primjenom tri bioinformatička algoritma	46
4.5.1. Analiza sukladnosti interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-1 prema skupini antiretrovirusnih lijekova primjenom tri bioinformatička algoritma	46
4.5.2. Analiza sukladnosti interpretacije rezultata rezistencije HIV-1 za pojedinačne antiretrovirusne lijekove prema tri bioinformatička algoritma	48
4.5.3. Analiza nesukladnosti rezultata testova rezistencije prema subtipu HIV-a	49
4.6 Genotipizacija HIV-1	49

5. RASPRAVA	52
6. ZAKLJUČCI	60
7. LITERTURA	61
8. ŽIVOTOPIS	66

UVOD

1.1 Virus ljudske imunodeficijencije

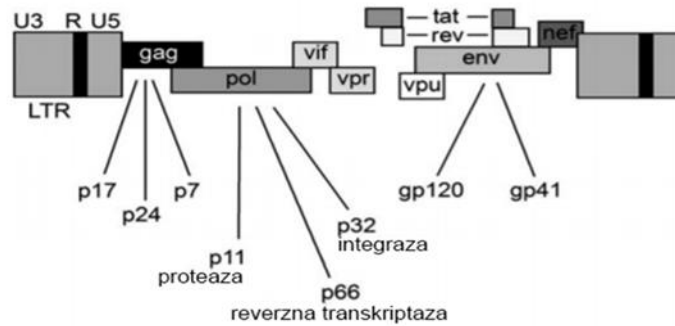
Virus ljudske imunodeficijencije (HIV, engl. *Human immunodeficiency virus*), povezan s globalnom pandemijom, identificiran je 1983. godine. Kronična infekcija ovim virusom uzrokuje bolest koju nazivamo sindromom stečene imunodeficijencije ili AIDS-om (AIDS, engl. *Acquired immunodeficiency syndrom*) (1). Prvi slučaj AIDS-a zabilježen je 1981. godine u SAD-u kod muškaraca koji je imao spolne odnose s muškarcima i bolovao od kronične multiple limfadenopatije. Kod istog je muškarca primijećena oportunistička infekcija uzrokovanom gljivom *Pneumocystis jirovecii* te Kaposijev sarkom (2). Pojavom sve većeg broja oboljelih od AIDS-a, kako u SAD-a tako i u zapadnoj Europi, znanstvenici diljem svijeta ujedinili su se kako bi otkrili uzročnika tada-nove pandemije. Dvije godine nakon prvog slučaja AIDS-a u svijetu, znanstvenici Françoise Barré-Sinoussi i Luc Montagnier iz Pasteurovog Instituta u Parizu, izolirali su virus iz limfnog čvora bolesnika i dokazali kako može inficirati i ubiti limfocite te da se radi o retrovirusu (3). Novootkriven virus nazvan je virus udružen s limfadenopatijom (LAV, fra. *Lymphadénopathie associé virus*), a godinu dana poslije, 1984. u SAD-u izoliran je identičan virus te nazvan ljudskim virusom leukemije T-limfocita (HTLV-III, engl. *Human T-cell leukemia virus*). Za njihov doprinos znanosti i otkriće virusa ljudske imunodeficijencije, Barré-Sinoussi i Montagnieru dodijeljena je 2008. godine Nobelova nagrada za fiziologiju ili medicinu (3). Usprkos aktivaciji brojnih mehanizama urođene i specifične imunosti (posebice protutijela i citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita), u zaraženih osoba ne dolazi do potpune supresije virusne replikacije. Stoga virus uzrokuje kroničnu infekciju koja je povezana sa sistemskom aktivacijom imunološkog sustava i progresivnom deplecijom CD4⁺-T-limfocita. Opseg deplecije CD4⁺ T-limfocita najvažniji je prediktor prediktori progresije bolesti koja, ukoliko se ne liječi, dovodi do smrti (4).

HIV je retrovirus (porodica *Retroviridae*, rod *Lentivirus*) i klasificira se u dva tipa: HIV-1 i HIV-2. Filogenetskim istraživanjima utvrđena je molekularna i evolucijska povezanost virusa imunodeficijencije majmuna (SIV, engl. *Simian immunodeficiency virus*), lentivirusa koji inficira mnoge vrste majmuna u subsaharskoj Africi i HIV-a. SIV_{cpzPtt} inficira čimpanze (*Pan troglodytes troglodytes*) i srodan je HIV-1, te je rasprostranjen na području Kameruna, dok je SIV_{sm} pronađen kod pepeljastih mangabija (*Cercocebus atys*) srodan HIV-2. Najraširenije prihvaćena teorija prijenosa SIV-a na ljude je konzumacija nedovoljno termički obrađenog mesa majmuna. Smatra se da su se ljudi zarazili u doticaju s krvlju i

mukoznim sekretima zaraženih majmuna. Dosadašnja filogenetička istraživanja upućuju da je do prijenosa virusa s majmuna na ljude došlo u nekoliko neovisnih događaja u razdoblju prije 1908. U istraživanju koje su proveli *Salemi i sur.*, sekvenciranjem *pol* gena lentivirusa, dokazano je postojanje zajedničkog pretka HIV-1 i SIV_{cpPtt} krajem 17. stoljeća. (5,6,7). Zanimljivo je da se pandemija HIV-a pojavila tek krajem 20. stoljeća, što se može povezati s promjenom strukture stanovništva te pojavom urbanizacije i globalizacije u svijetu (4).

1.1.2. Genom virusa

Genom HIV-1 veličine je 9.8 kb, a kao i većina retrovirusa koji su kompetentni za replikaciju sadrži tri glavna gena: *gag* (engl. *group-antigen*), *pol* (engl. *polymerase*) i *env* (engl. *envelope*) (Slika 1). Klasična struktura virusnog genoma je: 5' LTR-*gag-pol-env*-LTR 3'. Duga terminalna ponavljanja (LTR, engl. *Long terminal repeat*), su regije koje označavaju krajeve virusnog genoma i u direktnom su kontaktu sa staničnom DNA domaćina nakon integracije. LTR regije ne kodiraju virusne proteine, ali su vezna mjesta za regulatorne virusne proteine uključene u transkripciju (8,9). Geni *gag* i *env* kodiraju za nukleokapsidne i glikoproteine virusne membrane, a gen *pol* kodira za virusne proteine proteazu, reverznu transkriptazu i integrazu. mRNA *Gag* i *pol* se translatira u dugačak polipeptidni lanac kojeg virusna proteaza (kodirana genom *pol*), cijepa u pojedinačne funkcionalne proteine. Produkt *env* gena je glikoprotein gp160, kojeg virusna proteaza cijepa na gp120 i gp41, a koji se povezuju u trimere i ugrađuju u virusnu ovojnicu (9). Genom HIV-1 sadržava još šest gena (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* i *nef*) koji doprinose njegovoj genetičkoj kompleksnosti (Slika 1). Geni *nef*, *tat* i *rev* su eksprimirani u ranoj fazi replikacijskog ciklusa. Tat i Rev su regulatorni proteini koji se nakupljaju unutar jezgre i vežu se na TAR (engl. *transactivation-response elements*) regije unutar LTR te na regije RRE (engl. *rev response elements*) koje se nalaze unutar gena *env*. Protein Tat je transkripcijski aktivator promotorskih regija LTR i esencijalan je za virusnu replikaciju *in vitro*. Tat i Rev stimuliraju transkripciju provirusne DNA u RNA, promoviraju njenu elongaciju, pospješuju transport HIV-1 RNA iz jezgre u citostol te su nužni za prevođenje virusne mRNA (8). Nef ima ulogu u izbjegavanju stanične imunosti posredovane citotoksičnim CD8⁺ T-limfocitima, suprimirajući ekspresiju membranskih biljega (HLA-1) i koreceptorskih molekula (CD4⁺) u stanicama inficiranim HIV-1 (8,10).

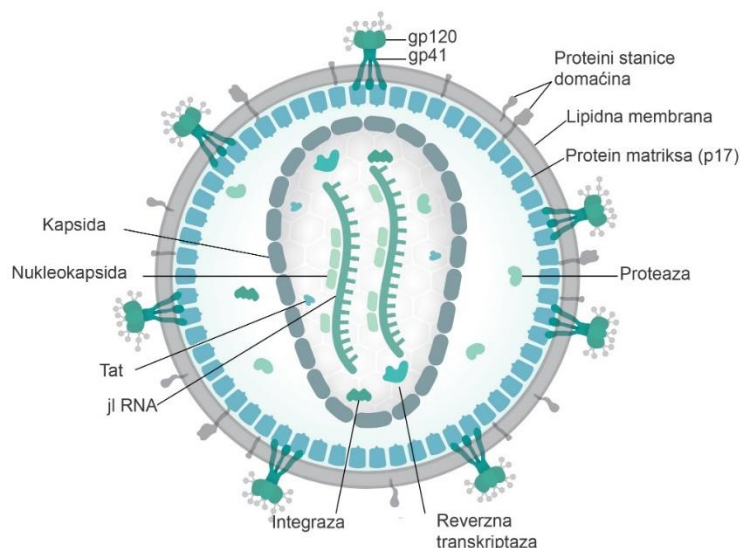


Slika 1. Struktura HIV-1 genoma

(prerađeno s: <https://hivbook.files.wordpress.com/2011/10/hivbook-2012.pdf>)

1.1.3. Struktura i replikacijski ciklus HIV-1

Virion ovog virusa ima promjer oko 100 nm te sadrži dvije molekule jednolančane RNA koje su međusobno povezane na 5' kraju. Unutar virusne kapside, RNA molekule su vezane za virusne enzime i proteine nukleokapside (p7). Kapsida se sastoji kapsidnog virusnog proteina (p24) a okružuje je ovojnica. Ovojnica virusa sastoji se od virusnog proteina matriksa (p17) i lipidne membrane koja sadrži 72 glikoproteinska kompleksa sastavljena od trimera veznog glikoproteina gp120 i transmembranskog proteina gp41. Glikoprotein gp120 ima značajnu ulogu u vezanju viriona za receptore i koreceptore domaćinske stanice, dok molekula gp41 posreduje u fuziji ovojnice virusa i membrane domaćinskih stanica (Slika 2)(10,11). Nakon ulaska u stanicu, djelovanjem virusnih proteaza, virusna se ovojnica odvaja od RNA a nakon toga virusna reverzna transkriptaza prepisuje jednolančanu RNA u dvolančanu DNA. Novonastala dvolančana DNA ugrađuje se u genom domaćina pomoću enzima virusne integraze te se naziva provirusnom DNA (10).

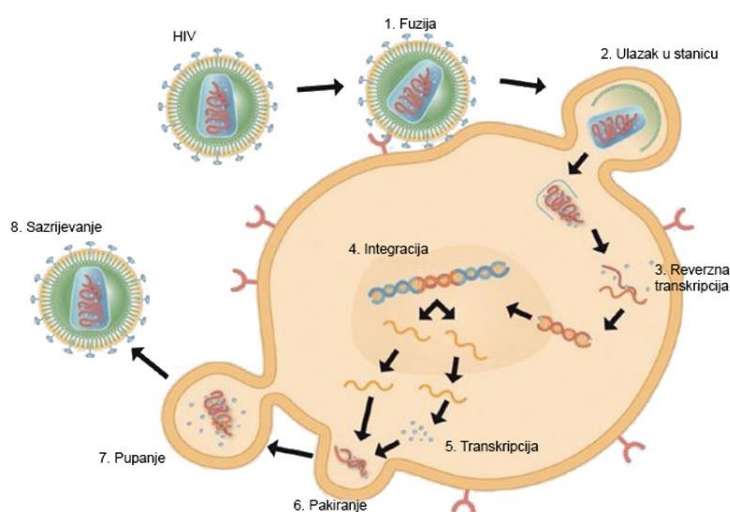


Slika 2. Struktura HIV-1 viriona
(prerađeno s <https://www.dreamstime.com/stock-photo-hiv-virus-particle-structure-image38001720>)

Replikacijski ciklus ovog virusa može se podijeliti u dvije glavne faze. Prva faza opisuje vrlo rane događaje tijekom infekcije HIV-om: vezanje viriona za stanicu domaćina, internalizacija virusne kapside u citoplazmu, reverznu transkripciju, transport dvolančane virusne DNA u jezgru stanice domaćina i integraciju u genom domaćinske stanice. Druga faza replikacijskog ciklusa započinje transkripcijom virusnih strukturnih gena te posljedične sinteze virusnih proteina i formiranja novih virusnih čestica (11,12).

Sposobnost HIV-1 da zarazi određene vrste stanica vezanjem na specifične membranske stanične receptore naziva se staničnim tropizmom virusa. Sojevi HIV-a koji koriste kemokinski receptor CCR5 nazivaju se R5-virusima ili CCR5- tropičkim virusima, dok se sojevi HIV-a koji koriste receptor CXCR4 nazivaju X4-virusima ili CXCR4-tropičkim virusima. Kemokinski receptori CCR5 se nalazi na makrofagima, dendritičnim stanicama i pomagačkim CD4+ T-limfocitima, a CXCR4 na aktiviranim T-limfocitima (10). Pojedini sojevi HIV-a koriste oba kemokinska koreceptora za ulazak u stanicu (sojevi dvojnog tropizma). R5-sojevi HIV-1 dominiraju u ranoj fazi infekcije i vjerojatno su odgovorni za većinu infekcije HIV-om u svijetu (11,13), Kod većine infekcija subtipom B HIV-1, R5-virusi prevladavaju tijekom rane faze, nakon čega kod 50% bolesnika s vremenom dođe do zamjene viralnog fenotipa u CXCR4-tropičke viruse što je povezano s progresivnom deplecijom CD4+ T-limfocita i pojavom AIDS-a (9,14). Molekula gp120 veže se velikim afinitetom za koreceptorsku molekulu CD4 na

membrani ciljne stanice. Budući da je koreceptorska molekula CD4 eksprimirana na pomagačkim CD4⁺ T-limfocitima (T_H, engl. *Helper T-cell*), makrofagima, stanicama mikroglije i dendritičnim stanicama, upravo su one najvažnije ciljne stanice za infekciju ovim virusom. Prije fuzije i ulaska virusa u stanicu, gp120 se mora također vezati za kemokinski receptor na membrani ciljne stanice (9). Vezanje molekule gp120 za primarni stanični koreceptor i kemokinski receptor omogućava molekuli gp41 fuziju virusne ovojnice i plazma membrane ciljne stanice te ulazak virusnog genoma i virusnih proteina u citoplazmu ciljne stanice. Nakon ulaska u stanicu domaćina, virusna reverzna transkriptaza prepisuje virusnu RNA u komplementarnu DNA (cDNA). HIV-1 integraza katalizira reakciju integracije cDNA u genom inficirane stanice. Infektivna faza HIV-1 započinje prevođenjem provirusne DNA u aktiviranim CD4⁺ T-limfocitima. Aktivirani CD4⁺T-limfociti eksprimiraju transkripcijski faktor NFκB koji se veže na promotore u njihovoj DNA, ali i na virusne LTR-ove što dovodi do prepisivanja virusne RNA pomoću staničnih RNA polimeraza. Nastali transkript se prekraja na više načina tvoreći zrelu mRNA molekulu. Gag i Gag-Pol proteini nastaju prevođenjem neprekrojene mRNA, dok proteini Vif, Vpr, Vpu i Env nastaju iz jednom prekrojene mRNA, a proteini Tat, Rev i Nef višestrukim prekrajanjem mRNA. Aktivacijom provirusa nastaju Tat i Rev proteini koji zajedno promoviraju virusnu replikaciju u aktiviranim T-limfocitima. Tat protein djeluje kao transkripcijski regulator koji uklanja negativne regulatore transkripcije s kompleksa RNA polimeraze II i time omogućava prepisivanje virusne RNA. Nastali transkripti transportiraju se iz jezgre (kao neprekrojeni ili jednom prekrojeni) te se prevode u strukturne proteine nukleokapside i ovojnice te se zajedno virusnim enzimima pakiraju u nove virusne čestice koje pupanjem izlaze iz stanice (Slika 3) (4,11,9).



Slika 3. Replikacijski ciklus HIV-1

(prerađeno s: <http://slideplayer.com/slide/3862912/>)

1.1.4 Genska varijabilnost HIV-1

Jedno od najznačajnijih bioloških obilježja HIV-1 je velika genska varijabilnost. Razlog tome je izuzetno visoka stopa mutacija koja se povezuje s izostankom 3'→5'-egzonukleazne aktivnosti virusne reverzne transkriptaze. Izostankom 3'→5'-egzonukleazne aktivnosti onemogućena je provjera novo ugrađenih nukleotida u rastući DNA lanac što dovodi do točkastih mutacija (delecije, insercije ili duplikacije) s frekvencijom od 10^{-2} do 10^{-4} . Osim pogreški uzrokovanih krivom ugradnjom nukleotida od strane reverzne transkriptaze, genskoj varijabilnosti HIV-1 pridonosi i visoka stopa replikacije (10^{10} - 10^{12} novih viriona/dan), visoka stopa virusne rekombinacije, velika populacija virusa te prirodna selekcija kao odgovor na stres uzrokovan antiretrovirusnim lijekovima i imunskim sustavom domaćina (14,15). Intenzivna virusna replikacija i visoka stopa mutacija rezultiraju formiranjem velikog broja genski srodnih virusnih varijanti virusne populacije koja se naziva kvazivirsa. Najvažnije karakteristike kvazivirske su intenzivne genske promjene u kontekstu kompeticije i selekcije genskih varijanti. Heterogenosti kvazivirske značajno pridonosi i proces rekombinacije virusnih varijanti (11,16). Sukladno populacijskoj genetici, frekvencija kojom je neka jedinka/varijanta zastupljena u populaciji, usko je povezana s njenom sposobnošću da preživi i da se razmnožava u određenim okolišnim uvjetima tj. njenim fitnessom. Tijekom replikacije sintetiziraju se različite genomske varijante koje su podložne stalnoj kompeticiji i selekciji. Iako je replikacijska sposobnost virusna najbitniji faktor njenog fitnessa, izbjegavanje imunskog odgovora, sposobnost prijenosa i stanični tropizam virusa od velike su važnosti za fitness virusnih kvazivirske. (14)

1.1.5. Imunopatogeneza HIV-1 infekcije

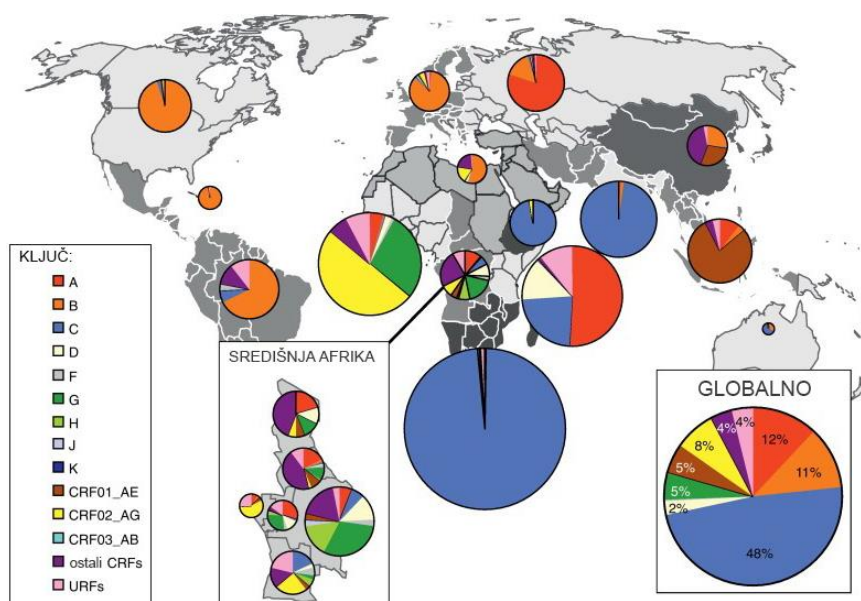
Najčešći putevi prijenosa HIV-1 su spolni odnosi, tjelesne tekućine (krv, majčino mlijeko) te vertikalni prijenos s majke na dijete. Tijekom spolnog prijenosa virusa, prve ciljne stanice zaraze ovim virusom su aktivirani, memorijski CCR5+ CD4+ T-limfociti u mukozi spolnih organa. Primarna (akutna) infekcija HIV-om često je asimptomatska dok se nakon nekoliko tjedana uspostavlja kronična doživotna infekcija. Tijekom akutne infekcije dolazi do intenzivne replikacije virusa u organizmu te aktivacije brojnih mehanizama urođene i specifične imunosti. U prepoznavanju zaraze HIV-om značajnu ulogu imaju receptori za prepoznavanje struktura PRR (engl. pathogen recognition receptors) poput Toll-u sličnih receptora i dr. koji prepoznaju virusnu dvolančanu RNA i virusne proteine te započinju sintezu proupalnih i regulacijskih citokina te interferona. Deplecija CD4+ T-limfocita u akutnoj infekciji rezultat je citolize

potaknute virusom. Virusni antigeni potiču specifičnu staničnu imunost posredovanu citotoksičnim CD8⁺ T-limfocitima. Oni ubijaju stanice zaražene virusom, međutim to ne može zaustaviti napredovanje infekcije. Citotoksičnim djelovanjem stanica CD8⁺ na zaražene stanice CD4⁺ još se više smanjuje njihov broj te je to razlog karakterističnom smanjenju omjera CD4⁺ i CD8⁺ T-limfocita u zaraženih osoba. Aktivirani citotoksični CD8⁺ T-limfociti uspostavljaju privremenu kontrolu replikacije virusa nakon čega dolazi do nastanka kronične infekcije. Nakon asimptomatske faze kronične infekcije (duljina najčešće 2-10 godina), dolazi do sve veće deplecije CD4⁺ T-limfocita te nastaje simptomatska faza HIV-bolesti koju karakterizira pojava brojnih oportunističkih infekcija i malignih bolesti (10).

1.1.6. Klasifikacija HIV-1

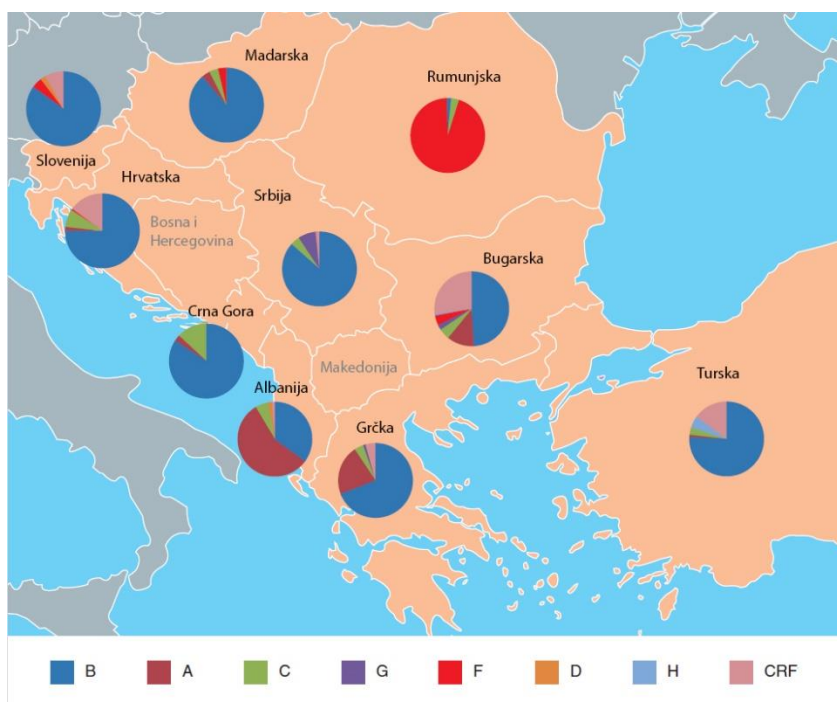
HIV-1 je lentivirus karakteriziran s visokim stupnjem genetičke raznolikosti. HIV-1 klasificira se u četiri grupe nastale tijekom četiri neovisna prijenosa SIV_{cpzPtt} (M,N,O) i SIV_{gor} (P) sa primata na ljude: grupa M (eng. *Major*), grupa O (engl. *Outliner*), grupa N (engl. *Non-M/Non-O*) te nedavno otkrivena grupa P. Grupa M je zaslužna za globalnu pandemiju HIV-1, dok su ostale tri grupe ograničene na područje središnje Afrike (17,18). HIV-1 grupa M se dalje dijeli u 9 podpova (A, B, C, D, E, F, G, H, J, i K) od kojih svaki predstavlja jedinstvenu liniju unutar grupe M. Grupe A i F se dalje mogu podijeliti u pod-podtipove (A1, A2, A3 i A3 te F1 i F2) koji također zadržavaju neke jedinstvene karakteristike, međutim nisu dovoljno genetički raznoliki da bi se svrstali u zaseban podtip (17). Kod pacijenata zaraženih s dva ili više različitih podtipa HIV-1 mogu se pojaviti rekombinantne forme dva podtipa, koje ukoliko imaju značajnu ulogu u širenju epidemije HIV-1, se nazivaju cirkulirajuće rekombinantne forme (CRF, engl. *circulating recombinant forms*) (17,18). Budući da se podtipovi HIV-1 razlikuju u nekim biološkim karakteristikama (različita stopa evolucije podtipa i varijacije u genomu mogu doprinijeti pojavi rezistencije na određeni lijek), njihova rasprostranjenost je bitna za epidemiološka i klinička istraživanja. Istraživanja Hemelaar i sur. 2011. godine opisala su rezultate analize molekularne epidemiologije HIV-1 u svijetu. Rezultati istraživanja pokazali su da je globalno najviše infekcija HIV-1 uzrokovano podtipom C (48%), iza kojeg slijede podtip A (11%), podtip B (11%), podtip G (5%) te podtip D (2%), a procjenjuje se da je globalna zastupljenost podtipova F, H, J i K zajedno manja od 1%. Najčešće cirkulirajuće rekombinantne forme HIV-1 u svijetu su CRF02_AG (8%) i CRF01_AE (5%). Podtip B je dominantan u Sjevernoj i Južnoj Americi, zapadnoj Europi, Japanu i Australiji. U zapadnoj i središnjoj Europi 85% HIV-1 infekcija uzrokovano je podtipom B. U Rusiji i državama bivšeg Sovjetskog

Saveza, ali i nekoliko afričkih zemalja (Demokratska Republika Kongo, Kenija, Tanzanija) prevladava podtip A. Podtip C je najviše zastupljen u južnoj Africi i Indiji, dok u Ugandi, Somaliji i Etiopiji prevladava podtip D. CRF01_AE na području JI Azije, dok je najveća prevalencija podtipova D,G i CRF02_AG na području sjeverne i zapadne Afrike (19). U zapadnoj Africi, regiji iz koje je pandemija HIV-1 potekla, pronađeno je najviše genetički različitih oblika virusa HIV-1 (Slika 4) (15).



Slika 4. Geografska rasprostranjenost podtipova HIV-1 i cirkulirajućih rekombinantnih formi u svijetu
(prerađeno s: [http://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914\(11\)00210-3](http://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(11)00210-3))

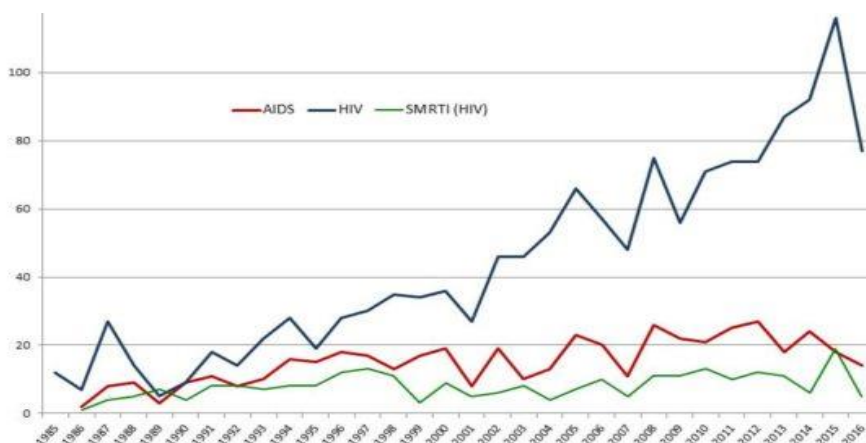
Istraživanje molekularne epidemiologije HIV-1 na Balkanu koje su proveli *Stanojević i sur.* 2013. (19), pokazalo je da je najviše infekcija HIV-1 uzrokovano podtipom B, osim u Rumunjskoj (podtip F) i Albaniji (podtip A) (Slika 5). U Hrvatskoj je 74% infekcija uzrokovano podtipom B, dok je od CRF najzastupljeniji CRF02_AG. Od ostalih podtipova u Hrvatskoj su također zastupljeni u različitom postotku podtip C, A i F, a od CRF (CRF01_AE, CRF05_DF, CRF10_CD) (19). Od rizičnih skupina u Hrvatskoj non-B podtipom su zaražene isključivo heteroseksualne osobe (pomorci i njihove partnerice), dok je skupina muškaraca koji imaju spolne odnose s muškarcima (MSM, engl. *Men who have sex with men*) zaražena isključivo podtipom B.



Slika 5. Distribucija HIV-1 podtipova i CRF na Balkanu (prerađeno od: Stanojević i sur.)

1.1.7. Epidemiologija HIV-1 infekcije u Hrvatskoj i ostatku svijeta

U Hrvatskoj je u razdoblju od 1985. godine do listopada 2016. godine otkriveno ukupno 1.403 osoba zaraženih HIV-om tipa 1, od čega ih je 474 (34 %) oboljelo od AIDS-a. U tom su razdoblju od AIDS-a umrle 202 osobe. U 2016. godini (do listopada) zabilježeno je 77 novih slučajeva HIV-1 infekcije i AIDS-a, što je na razini prošle godine, te se nastavlja blag porast pojavnosti (20).



Slika 6. Broj osoba zaraženih HIV-om, AIDS-om i smrti od HIV/AIDS-a u Hrvatskoj po godinama, za razdoblje od 1985.-2016. godine (preuzeto s : <http://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zaraznebolesti/epidemiologija-hiv-infekcije-i-aids-a-u-hrvatskoj/>)

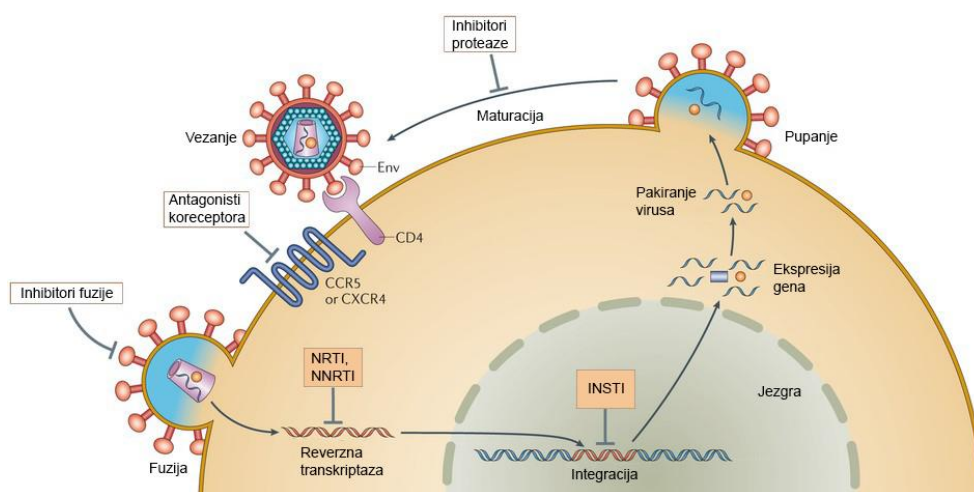
Hrvatska se ubraja u zemlje s niskom učestalošću HIV-1 infekcije sa stopom od 21 na milijun stanovnika (63/1 milijun je prosjek za zemlje EU/EEA u 2015.). Većina zaraženih osoba u Hrvatskoj su muškarci (88%), a prema putu prijenosa dominira nezaštićeni spolni odnos (89%). Najzastupljenija rizična skupina u Hrvatskoj je MSM (61,8%) (20).

Prema podacima UNAIDS-a do kraja 2015. godine, u svijetu živi u prosjeku 36,7 (34,0-39,8) milijuna ljudi zaraženih HIV-om. U prosjeku 1,1 (940 000-1,3) milijun ljudi preminulo je u svijetu od AIDS-a. Tijekom 2015. godine u svijetu je otkriveno u prosjeku 2.1 (1,8-2,4) milijun novih slučajeva zaraze HIV-om. Procjenjuje se je da se u prosjeku 5700 osoba dnevno zarazi HIV-om, od koji 55% spada u dobnu skupinu od 15-24 godine. Od ukupno 5700 osoba, 66% se odnosi na područje Subsaharske Afrike (21).

1.2. Antiretrovirusno liječenje

Početak znanstvenog napretka u području liječenja HIV-1 infekcije povezuje se s 1996. g. kada je započela primjena vrlo djelotvornog antiretrovirusnog liječenja (HAART, engl. *Highly active antiretroviral therapy*). Primarni cilj antiretrovirusne terapije (engl. ART, *antiretroviral therapy*) je smanjiti morbiditet, produžiti životni vijek, poboljšati kvalitetu života, očuvati i obnoviti imunost sustav te spriječiti prijenos HIV-1 kod zaraženih osoba (22). HAART se sastoji od kombinacije tri ili više antiretrovirusnih lijekova iz različitih skupina. U kombiniranoj antiretrovirusnoj terapiji (engl. cARV, *combination antiretroviral therapy*) kao okosnica (engl. backbone) terapije koja se sastoji od dva lijeka, koriste se lijekovi iz skupine NRTI (engl. *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*), dok je treći lijek iz ostalih skupina lijekova (23). Unatoč uspjehu u kontroliranju virusne replikacije i sprječavanju progresije bolesti, antiretrovirusni lijekovi ne mogu eradicirati virus što znači da su pacijenti na doživotnoj terapiji (24). Trenutno su dostupna 29 antiretrovirusna lijeka, koji se dijele na pet različitih skupina, odobrena od strane Američke agencije za lijekove (FDA, engl. *Food and drugs administration*) i Europske agencija za lijekove (EMA, engl. *European medicines agency*) (22). Ciljne strukture antiretrovirusnih lijekova su pojedine faze replikacijskog ciklusa HIV-1: (1) ulazak u stanicu domaćina (inhibitori ulaska), (2) reverzna transkripcija (nukleozidni/nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze, ne-nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze), integracija virusne DNA u stanični genom (inhibitori integraze), (3) sazrijevanje virusnih čestica (inhibitori proteaze) (Slika 7) (23). Dugoročni pozitivni učinci HAART-a često su narušeni pojavom rezistencije i/ili nuspojavama na određeni lijek te metaboličkom toksičnošću pojedinog lijeka

(24). Stručna društva za istraživanje HIV-1 infekcije EACS (European AIDS Clinical Society) i IAS-USA (International Antiviral Society-USA) preporučuju liječenje svih osoba s dijagnosticiranom HIV-infekcijom bez obzira na CD4+ T-limfocita (25). Uspješnost supresije virusne replikacije primjenom antiretrovirusnih lijekova procjenjuje se kvantifikacijom HIV-1-RNA u plazmi liječene osobe. Ukoliko u razdoblju od 4 do 6 mjeseci nakon započinjanja antiretrovirusnog liječenja, viremija u plazmi iznosi (broj kopija HIV-1-RNA po mL) 20-40 kopija HIV-1-RNA po mL (niža od granice detekcije testova PCR u realnom vremenu), smatra se da je postignut virološki uspjeh liječenja. Nepotpuno smanjenje virusne replikacije, tj. mjerljiva viremija u plazmi nakon 6 mjeseci liječenja definira se kao virološki neuspjeh liječenja i najčešće se povezuje s nastankom rezistencije virusa na lijekove (11).



Slika 7. Ciljne mete antiretrovirusnih lijekova (prerađeno s:

<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v12/n11/abs/nrmicro3351.html>)

1.2.1. Inhibitori reverzne transkriptaze

Reakcija konverzije virusne jednolančane RNA u dvolančanu provirusnu DNA, naziva se reverzna transkripcija, a katalizira je reverzna transkriptaza. RT je enzim koji posjeduje RNA i DNA ovisnu DNA polimeraznu i RNaznu H aktivnost te enzimsku aktivnost prijenosa i zamjene lanaca. RT je heterodimer sastavljen od dvije pojedince (p66 i p51) veličine 66 i 51 kDa, koje nastaju proteolitičkim procesiranjem velikog prekursor proteina Gag-Pol. Obje podjedinice se sastoje od domene prstiju (engl. *fingers*), dlana (engl. *palm*), palca (engl. *thumb*) i poveznice (engl. *connection*) (23). Aktivno mjesto za DNA-polimeraznu aktivnost s

konzerviranim aminokiselinskim ostacima Asp110, Asp185 i Asp186, koji vežu dva dvovalentna kationa magnezija (Mg^{2+}) potrebna za katalizu te regijom YMDD (Y183- M184-D185-D-186), smješteno je unutar domene dlana podjedinice p66 (11,26). Unutar stanice, NRTI (NRTI, engl. *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) se fosforiliraju u trifosfatni oblik te na taj način djeluju kao kompetitivni inhibitori (analozi dNTP-a) HIV-1 RT. Lijekovi iz skupine NRTI dijele se na nukleozidne inhibitore: zidovudin (ZDV/AZT), lamivudin (3TC), stavudin (d4T), didanozin (ddI), zalcitabin (ddC), abakavir (ABC) i emtricitabin (FTC) te nukleotidni inhibitor ili aciklički nukleozidni fosfonat tenofovir (TDF), koji se od 2016. koristi kao tenofivir alafenamid (TAF) (26,27) . Za razliku od NRTI, NNRTI (NNRTI, engl. *Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*) su alosterički ne-kompetitivni inhibitori, koji se vežu u hidrofobni utor blizu polimeraznog aktivnog mjesta na p66 podjedinici i induciraju strukturne modifikacije koje smanjuju brzinu ugradnje nukleotida (dNTP-a). Druga značajna promjena koja se događa uslijed vezanja NNRTI, je smanjenje mobilnosti domene palca podjedinice p66. Ta promjena uzrokuje smanjenje ili potpunu blokadu prijenosa kompleksa početnice i ciljne sekvence te elongaciju DNA-lanca u nastanku. U NNRTI skupinu ubrajaju se lijekovi nevirapin (NVP), delavirdin (DLV), efavirenz (EFV), etravirin (ETV) i rilpivirin (RPV). Delaviridin i zalcitabin se više ne primjenjuju u liječenju (11,26,28).

1.2.2. Inhibitori proteaze

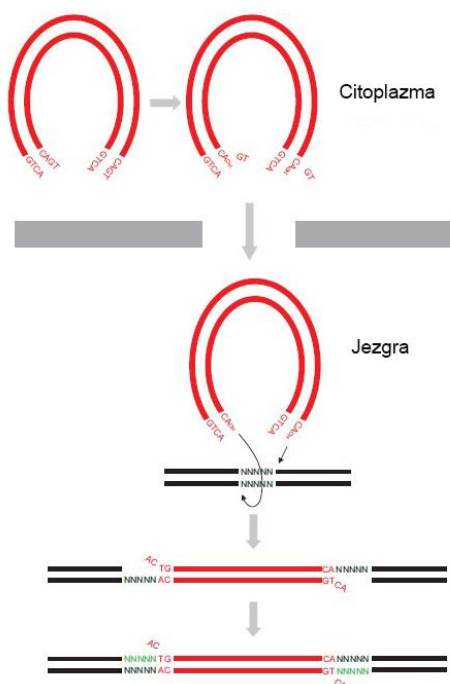
HIV-1 proteaza ima ulogu u cijepanju Gag i Gag-Pol poliproteina, nastalih translacijom provirusnih transkripata, na manje funkcionalne proteine omogućavajući sazrijevanje viriona. HIV-1 proteaza je simetrični homodimer sastavljen od dva polipeptidna lanca. U svakom monomeru nalazi se konzervirana sekvenca od tri aminokiselinska ostatka (Asp25-Thr26-Gly27) s aspartilnom grupom važnom u reakciji katalize kao i preklopnica (aminokiselinski ostaci 42-58) čija fleksibilnost je bitna za aktivnost enzima. Na dodiru dvije podjedinice nalazi se aktivno mjesto enzima. Inhibitori se na asimetričan način vežu za enzim kao i prirodni mu supstrati koji se vežu na aktivno mjesto enzima (11,23). Trenutno odobreni inhibitori proteaze koji se koriste u liječenju HIV-1 infekcije su: saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), nelfinavir (NFV), fosamprenavir (FPV), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), tipranavir (TPV) i darunavir (DRV). Svi proteazni inhibitori (PI, engl. *protease inhibitors*), osim tipranavira se temelje na supstratima koji djeluju kao kompetitivni inhibitori proteolitičkih reakcija nužnih za sazrijevanje virusa. Unatoč uspjehu u kontroliranju virusne replikacije, efikasnost inhibitora proteaze ograničena je zbog štetnih učinaka (poremećaji u metabolizmu

lipida i glukoze), nepovoljnim interakcijama s drugim lijekovima i povećanju virusne otpornosti (23). Farmakološke značajke PI (osim nelfinavira) pojačane su kombiniranjem s malim dozama ritonavira (engl. *"boosted PI"*) koji inhibira citokrom P450 i time produljuje djelovanje ostalih PI (29).

1.2.3 Inhibitori integraze

Nakon ulasku HIV-1 u stanicu domaćina i sinteze dl DNA kopije svog RNA genoma, virus se ireverzibilno ugrađuje u stanični genom. Integracija virusne DNA u stanični genom katalizirana je enzimom integraza. Integraza katalizira dvije glavne enzimske reakcije kojom omogućuje ugradnju virusne DNA. Početna reakcija, nazvana "procesiranje 3' kraja", u kojoj integraza cijepa dinukleotid na oba kraja DNA, priprema krajeve virusne DNA za ugradnju u genom stanice. Nakon ove reakcije, oba kraja DNA virusa sadržavaju slobodnu 3'OH skupinu na terminalnom adenzinu koji je dio konzerviranog CA dinukleotida (30). Procesiranje 3' kraja odvija se u citoplazmi unutar preintegracijskog kompleksa (PIC, engl. *preintegration complex*) koji se sastoji od virusne DNA udružene s staničnim (LEDGF, engl. *lens epithelium-derived growth factor*) i virusni proteinima (IN, RT, p24, p17, Vpr) (30,31). PIC zatim pomoću proteinskog kompleksa jezgrinih pora ulazi aktivnim transportom u jezgru. Tijekom druge enzimske reakcije, reakcije izmjene lanaca, slobodna 3' OH grupa na krajevima virusne DNA nukleofilno napada fosfodiesterску vezu u ciljnoj DNA na mjestima koja su međusobno udaljena 5 pb. 3' krajevi virusne DNA ligiraju se zajedno s ciljnom DNA, a nespareni CA dinukleotidi na neligiranom virusnom lancu DNA se cijepaju. Na kraju se praznine od 5 pb popunjavaju nukleotidima i ligiraju. U popravku pocijepanih lanaca vjerojatno sudjeluju DNA enzimi popravka domaćina. (Slika 8) (30) Integraza se nalazi na C-kraju Gag-Pol prekursor poliproteina i veličine je 32 kDa (288 aminokiselina). RT i integraza su kovalentno povezane na C-terminalnom kraju Gag-Pol poliproteina. Integraza je podijeljena u tri funkcionalne i strukturne domene : N-terminalna domena (NTD), domena katalitičke srži (CCD, engl. *catalytic core domain*) i C-terminalna domena (CTD) (Slika 9). Domena NTD (1-47) se sastoji od tri α zavojnice koje sadrže dvostruki histidinsko/cisteinski (H₁₂-H₁₆-C₄₀-C₄₃) cink-vezujući motiv (engl. *zinc-binding motif*). Cink-vezujući motiv ima ulogu u dimerizaciji IN monomera i vezanju staničnih faktora. CCD domena (59-202) sadrži aktivno mjesto koje se sastoji se od trijade aminokiselinskih ostataka D64, D116 i E152 (DDE motiv). Ovaj motiv je ključan u koordinaciji dvovalentnih iona metala (Mg²⁺ ili Mn²⁺), koji su ključni za enzimsku funkciju IN. CTD domena (223-270), sadrži SH3 domene koje se nespecifično vežu za DNA. Integraza se

za DNA veže kao tetramer sastavljen od dva simetrična dimera (heterodimer), od kojih se svaki veže na jedan 3' kraj virusne DNA. Minimalni kompleks potreban za integraciju u staničnu DNA je intasom i sastoji se od IN-DNA. (30,31)



Slika 8. Mehanizam integracije virusne DNA u stanični genom kataliziran integrasom HIV-1 (prerađeno od: Mbisa i sur. (30))

Strukturni model HIV-1 intasoma pokazuje da su krajevi virusne DNA koji se nalaze u aktivnom mjestu enzima udaljeni $\sim 1,8$ nm, što odgovara duljini 5 pb. Aktivno mjesto integraze je ciljna struktura inhibitora integraze. Nedavno je otkrivena uloga LEDGF/p75 u integraciji virusne DNA u genom stanice. LEDGF/p75 sadrži DNA vezujuću domenu i IN-vezujuću domenu (engl. *IN-binding domain*) koja se veže za CCD domenu integraze u kojoj je aktivno mjesto. Na taj način LEDGF/p75v povezuje IN i DNA stanice domaćina. Otkrićem funkcije LEDGF/p75 u integraciji virusne DNA, dovelo je do razvoja nove skupine lijekova koji će služiti kao alosterički inhibitori integraze (engl. ALLINI, *allosteric integrase inhibitors*). (32)



Slika 9. Organizacija domena integraze HIV-1. Broj aminokiselinskih ostataka su naznačeni u svakoj domeni. NTD (1-47) s HH-CC motivom, CCD (59-202) i CTD (223-270). Domene su odvojene proteinskim poveznicama (engl. *linker*) različitih duljina (preuzeto s: <http://www.wjgnet.com/1949-8454/full/v6/i3/83.htm>)

Inhibitori integraze (INSTI, engl. *Integrase strand transfer inhibitors*) najnovija su skupina antiretrovirusnih lijekova odobrenih u liječenju HIV-1 infekcije. INSTI uključuju tri lijeka: raltegravir (RAL), elvitegravir (ELG) i dolutegravir (DTG) (30). INSTI su strukturno raznolike molekule koje se sastoje od motiva koji veže dvovalentne katione Mg^{2+} ili Mn^{2+} CCD domene i hidrofobne regije za vezanje šupljine formirane od strane integraze i 3' kraja virusne DNA (CA dinukleotid) (22). INSTI sadržavaju funkcionalnu skupinu koja je analog diketo kiselinama, kojom se vežu za divalentne katione u aktivnom mjestu integraze (30). Budući da u ljudskom organizmu ne postoji enzim koji je funkcionalno homologan virusnoj integrazi, ovi lijekovi imaju mali broj nuspojava, a osim što su nisko toksični, INSTI su i visoko efikasni u potiskivanju replikacije HIV-1 (25,33). RAL i EVG imaju nisku gensku barijeru za rezistenciju i kratak poluživot dok se za najnoviji INSTI, DTG pokazalo da ima povoljna farmakokinetička svojstva kao što je dug poluživot unutar stanice te konzumiranje jednom dnevno bez pojačavanja s ritonavirovom ("r") (24). Stručna društva preporučaju terapiju zasnovanu na INSTI u kombinaciji s NRTI kao terapiju prve linije (engl. *first-line therapy*).

1.2.4. Inhibitori ulaska virusa u stanicu

Ulazak HIV-1 u stanicu postala je značajna ciljna struktura za razvoj lijekova. Ulazak virusa u stanicu može se podijeliti na četiri, međusobno povezana koraka na koje mogu djelovati inhibitori ulaska: 1) spajanje virusa s površinom stanice, 2) vezanje virusa za stanični CD4 receptor, 3) interakcija kompleksa CD4 i glikoproteina s kemokinskim receptorima, 4) fuzija virusa i stanice. Inhibitori ulaska, kao i INSTI, spadaju u novu generaciju antiretrovirusnih lijekova. U kliničkom liječenju HIV-1 infekcije, do sada su odobreni: antagonist CCR5-koreceptora maravirok (MVC) i inhibitor fuzije enfuvirtid (T-20). Maravirok je selektivni antagonist koreceptora CCR5 koji se alosterički veže za njegov hidrofobni džep koji se sastoji od transmembranskih uzvojnica. Vezanjem na koreceptor, maravirok potiče konformacijske promjene unutar molekule što rezultira inhibicijom njegovog vezanja na gp120. Progresijom bolesti smanjuje se postotak CCR5-tropičkih virusa te samim time i mogućnost primjene MVC. Fuzija virusa sa staničnom membranom posredovana je transmembranskim glikoproteinom 41 (gp41). Enfuvirtid inhibira konformacijske promjene u gp41 koje onemogućavaju fuziju viriona sa staničnom membranom (23).

1.3. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove

Pojava rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove zabilježena je kod bolesnika liječenih s jednim antiretrovirusnim lijekom (monoterapija) što je dovelo do primjene vrlo djelotvornog antiretrovirusnog liječenja koje kombinira najmanje tri antiretrovirusna lijeka iz različitih skupina lijekova. HAART sprečava pojavu rezistencije virusa na lijekove u većine zaraženih osoba (33). Rezistencija na antiretrovirusne lijekove definira se kao smanjena osjetljivost virusa na lijekove iz čega slijedi potreba primjene iznimno velikih koncentracije lijekova za suprimiranje HIV replikacije u odnosu na divlji tip virusa. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove je evolucijski značajna strategija preživljavanja virusa, koja proizlazi iz njegove genetičke raznolikosti. U svake HIV-om zaražene osobe postoji mala, ali raznolika populacija genetskih varijanti unutar kvazivrste, a ovisno o okolišnim uvjetima svaka virusna varijanta u kvazivrsti ima različiti replikativni potencijal (17,34). Divlji tip (engl. *wild-type*) je varijanta koja ima veću mogućnost replikacije u odsustvu terapije te samim time prevladava u neliječenih pacijenta. Stalna replikacija virusa pod utjecajem određenog antiretrovirusnog lijeka dovodi do nakupljanja još većeg broja mutacija povezanih s rezistencijom (34). Prekid primjene antiretrovirusnih lijekova dovodi do brze replikacije divljeg tipa virusa koji ponovno postaje dominantna forma virusa u organizmu. Virusne varijante s mutacijama koje se povezuju s rezistencijom i dalje ostaju u virusnim rezervoarima kao manjinske varijante koje mogu ponovno postati dominantne pod selektivnim pritiskom lijekova (11,34). Vjerojatnost razvoja rezistencije ovisi o biološkoj aktivnosti antiretrovirusnog lijeka i stupnju replikacije u prisustvu istog lijeka. Lijekovi koji ima nisku antivirusnu aktivnost stvaraju minimalni selektivni pritisak na virus i vode k usporenom razvoju rezistencije, dok nešto snažniji lijekovi koji ne uspijevaju suzbiti replikaciju povećavaju selektivni pritisak na virus koji ubrzo postaje rezistentan. Lijekovi koji iskazuju snažan antivirusni učinak te suzbijaju virusnu replikaciju na minimalnu razinu, povezani su sa sporim razvojem rezistencije, usprkos visokom selektivnom pritisku na virus. Svaki antiretrovirusni lijek karakterizira različita genska barijera za rezistenciju. Genska barijera lijeka za rezistenciju definirana je kao broj mutacija potrebnih za nastanak rezistencije virusa na lijek. Rezistencija virusa na antiretrovirusne lijekove s niskom genskom barijerom posljedica je samo jedne mutacije. U tu skupinu lijekova spadaju lamivudin i emtricitabin (NRTI), nevirapine, efavirenz i delaviridin (NNRTI), inhibitor proteaze nelfinavir i inhibitor fuzije enfuvirtid (34). U skupinu lijekova s umjerenom genskom barijerom spadaju raltegravir i elvitegravir (INSTI), didanozin, abakavir i tenofovir (NRTI), etravirin (NNRTI) i većina PI koji nisu pojačani s ritonavirom. U skupinu lijekova s visokom genskom barijerom za koje je

potreban velik broj mutacija za nastanak rezistencije, spadaju dolutegravir (INSTI), ritonavirom pojačani inhibitori proteaze i zidovudin i stavudin (NRTI) (11,34). Visoka genska barijera lijeka za rezistenciju ne vodi nužno ka boljem ishodu liječenja. Ishod liječenja ovisi i o drugim relevantnim faktorima kao što su: tolerancija na lijek, toksičnost lijeka i propisno uzimanje terapije (34). **Rezistencija** na antiretrovirusne lijekove dijeli se na primarnu i sekundarnu rezistenciju. Primarna rezistencija javlja se u neliječenih osoba već zaraženima rezistentnim virusom. Istraživanje *Grgić i sur.* (2012.) na pacijentima koji su liječeni u Hrvatskom referentnom centru za HIV/AIDS od 2006.-2008., pokazalo je visoku prevalenciju primarne rezistencije na lijekove (engl. TDR, *transmission drug resistance*) kod novo dijagnosticiranih pacijenata u Hrvatskoj (35). Rezistencija nastala pod selektivnim pritiskom lijekova naziva se sekundarna ili stečena rezistencija (11,34). Zbog sličnosti molekularne strukture između lijekova unutar iste skupine i njihovih interakcija sa sličnim ciljnim strukturama, pojava rezistencije na jedan lijek, često dovodi do križne rezistencije na ostale lijekove unutar iste skupine antiretrovirusnih lijekova (34). **Mutacije** se dijele na primarne i sekundarne. Primarne mutacije nastaju nakon gubitka kontrole virusne replikacije i uzrokuju značajan gubitak osjetljivosti virusa na lijekove, a mogu se javiti i u neliječenih osoba zbog brze replikacije i vrlo visoke stope mutacija virusa. Sekundarne mutacije javljaju se nakon selekcije primarnih mutacija i samostalno ne utječu na pojavu rezistencije ali u kombinaciji s primarnim mutacijama mogu povećati rezistenciju na određeni lijek (11). Neke mutacije koje omogućuju visoku razinu rezistencije virusa na određeni lijek, mogu istovremeno povećati osjetljivost virusa na neki drugi lijek. Takve mutacije najčešće smanjuju replikacijsku sposobnost virusa u usporedbi s divljim tipom virusa (34).

1.3.1. Rezistencija na nukleozidne i nukleotidne inhibitore reverzne transkriptaze

Dva su mehanizma rezistencije HIV-1 na ovu skupinu lijekova: prvi mehanizam obuhvaća diskriminatorne mutacije koje onemogućuju vezanje inhibitora na aktivno mjesto u enzimu. Najčešće diskriminatorne mutacije uključuju M148V/I, K65R, K70E/G, L74V, Y115F i skupinu mutacija Q151M. Drugi mehanizam uključuje mutacije koje mijenjaju aminokiseline blizu aktivnog mjesta reverzne transkriptaze i uzrokuju veću učestalost izrezivanja već ugrađenog terminatora lanca DNA. Mutacije povezane s drugim mehanizmom, nazivaju se mutacije timidinskih analoga (engl. TAM *thymidine analogue mutations*) i dijele se u dvije skupine. TAM I uključuje mutacije M41L, L210W i T215Y/F dok skupina TAM II obuhvaća D67N, K70R, K219E/Q i T215F (Slika 10) (29).

	184	65	70	74	115	41	67	70	210	215	219	69	151
Cons	M	K	K	L	Y	M	D	K	L	T	K	T	Q
3TC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
FTC	<u>VI</u>	R	E									Ins	M
ABC	VI	<u>R</u>	E	<u>VI</u>	<u>F</u>	L			W	YF		<u>Ins</u>	<u>M</u>
TDF	***	<u>R</u>	E		F	L			W	YF		<u>Ins</u>	M
ZDV	***	***	*	*		L	N	R	W	<u>YF</u>	QE	<u>Ins</u>	<u>M</u>

Slika 10. Mutacije povezane s rezistencijom na NRTI/NtRTI. Brojevi označavaju poziciju aminokiseline u proteinu. Slova u prvom redu označavaju aminokiselinske sekvence divljeg tipa, a one nastale mutacijama, slovima su prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije, podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju, a ne podebljane mutacije uzrokuju nisku razinu rezistencije. *** povećana osjetljivost na lijek ako je mutacija prisutna.

Cons=konsenzus divlji tip; Ins=insercija

(prerađeno prema: <https://hivdb.stanford.edu/>)

1.3.2. Rezistencija na nenukleozidne inhibitore reverzne transkriptaze

Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NNRTI uglavnom mijenjaju aminokiseline koje su smještene u aktivnom mjestu RT ili u njegovoj blizini što onemogućava vezanje NNRTI. Najčešće mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI su K103N i Y181C, a često se javljaju i mutacije L100I, K101E, V106A, V179D, Y188L, G190A i P236L (Slika 11). Genska barijera za razvoj rezistencije na NNRTI je relativno niska (potrebna jedna mutacija za razvoj rezistencije) (29).

	100	101	103	106	138	179	181	188	190	227	230
Cons	L	K	K	V	E	V	Y	Y	G	F	M
NVP	<u>I</u>	<u>PEH</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>		DEF	<u>CIV</u>	<u>LCH</u>	<u>ASEQ</u>	LC	<u>L</u>
EFV	<u>I</u>	<u>PEH</u>	<u>NS</u>	<u>AM</u>		DEF	C	<u>LCH</u>	<u>ASEQ</u>	LC	<u>L</u>
ETR	<u>I</u>	<u>PEH</u>					<u>CIV</u>		EQ	C	L
RPV	<u>I</u>	<u>PEH</u>			<u>KAGQ</u>	DEF	<u>CIV</u>	<u>L</u>	<u>EQ</u>	<u>C</u>	<u>L</u>

Slika 11. Mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI. Brojevi označavaju poziciju aminokiseline u proteinu. Slova u prvom redu označavaju aminokiselinske sekvence divljeg tipa, a one nastale mutacijama, slovima su prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije, podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju, a ne podebljane mutacije uzrokuju nisku razinu rezistencije. Cons=konsenzus divlji tip

(prerađeno prema: <https://hivdb.stanford.edu/>)

1.3.3. Rezistencija na inhibitore proteaze

Rezistencija na inhibitore posljedica je mutacija koje mijenjaju aminokiseline u području aktivnog mjesta proširujući ga što dovodi do slabijeg vezanja inhibitora ali i prirodnog mu supstrata proteina Gag. Mutacije povezane s rezistencijom na PI dijele se na primarne (ili glavne) i sekundarne (ili popratne) mutacije (Slika 12)(11, 29). Za nastanak rezistencije potrebne su najmanje dvije mutacije jer je genska barijera PI relativno visoka (29).

	24	32	46	47	48	50	54	76	82	84	88	90
Cons	L	V	M	I	G	I	I	L	V	I	N	L
ATV/r		I	IL	V	VM	<u>L</u>	VTAM		ATSF	<u>V</u>	<u>S</u>	M
DRV/r		I		VA		V	LM	V	F	V		
LPV/r	I	I	IL	<u>VA</u>	VM	V	VTALM	V	ATSF	V		M

Slika 12. Mutacije povezane s rezistencijom na PI. Brojevi označavaju poziciju aminokiseline u proteinu. Slova u prvom redu označavaju aminokiselinske sekvence divljeg tipa, a one nastale mutacijama, slovima su prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije, podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju, a ne podebljane mutacije uzrokuju nisku razinu rezistencije. Cons=konsenzus divlji tip
(prerađeno prema: <https://hivdb.stanford.edu/>)

1.3.4. Rezistencija na inhibitore integraze

Kao i kod ostalih skupina antiretrovirusnih lijekova, rezistencija na INSTI uzrokovana je primarnim mutacijama koje smanjuju osjetljivost, a u kombinaciji sa sekundarnim mutacijama pridonose još većem smanjenju osjetljivosti virusa na lijek i/ili kompenziraju smanjenjem virusnog fitnessa povezanog s primarnim mutacijama (22,36). Rezistencija na RAL i EVG nastaje kao posljedica primarnih mutacija u dijelu *pol* gena koji kodira za sintezu aminokiselina u aktivnom mjestu IN. Primarne mutacije povezane s rezistencijom na RAL su: Y143C/H/R, Q148H/K/R i N155H. Ove su mutacije povezane s virološkim neuspjehom liječenja i smanjenom osjetljivosti virusa (24,36). Primarne mutacije koje vode k pojavi rezistencije na EVG su: T66I, E92Q, N155H i Q148H/K/R. Križna rezistencije između RAL i EVG česta je pojava zbog mutacija na istoj poziciji u genu (Q148H/R/K, N155H). Primarna mutacija Q148H koja je povezana s pojavom rezistencije na RAL i EVG te pojavom križne rezistencije na ta dva lijeka, može utjecati na rezistenciju na DTG ukoliko je u kombinaciji s još dvije dodatne mutacije. U usporedbi s prvom generacijom inhibitora integraze, DTG ima višu gensku barijeru za rezistenciju (36). Razlog tome je spora stopa disocijacije sa IN-DNA kompleksa što mu omogućava njegova struktura. DTG sadržava poveznicu (engl. *linker*) koja dozvoljava difluorofenilnoj grupi dublji ulazak u utor aktivnog mjesta integraze. Također, DTG ima

sposobnost prilagoditi svoju strukturu i konformaciju, što mu omogućava vezanje integraze u RAL i EVG rezistentnim virusima (22). DTG se preporuča odraslim osobama koje nisu prethodno bile na terapiji s INSTI. Za održavanje efikasnosti DTG pojačavanje s ritonavirovom nije potrebno. DTG je jedinstven među svim antiretrovirusnim lijekovima, jer do sada nije zabilježen niti jedan virološki neuspjeh kod neliječanih pacijenata na terapiji sa DTG. Razlog su mutacije (R263K, H51Y, G118R) koje istovremeno smanjuju osjetljivost virusa na DTG, no znatno utječu na smanjenje replikacijske sposobnost virusa te aktivnost integraze. Samim time virus ne može nakupiti još dodatnih mutacija koje bi utjecale na njegovu rezistenciju na ostale skupine antiretrovirusnih lijekova jer dodatne mutacije također smanjuju replikacijsku sposobnost virusa. Virusima koji su nakupili mnoštvo mutacija povezanih s rezistenijom na DTG, replikacijska sposobnost u zaraženih osoba je minimalna (22,36).

	66	92	138	140	143	147	148	155
Cons	T	E	E	G	Y	S	Q	N
RAL	A	Q	KA	SAC	<u>CRH</u>		<u>HRK</u>	<u>H</u>
EVG	<u>IAK</u>	<u>Q</u>	KA	SAC		<u>G</u>	<u>HRK</u>	<u>H</u>
DTG		Q	KA	SAC			HRK	

Slika 13. Mutacije povezane s rezistencijom na INSTI. Brojevi označavaju poziciju aminokiseline u proteinu. Slova u prvom redu označavaju aminokiselinske sekvence divljeg tipa, a one nastale mutacijama, slovima su prikazane ispod crte. Podebljane i podcrtane mutacije uzrokuju visoku razinu rezistencije, podebljane mutacije uzrokuju umjerenu rezistenciju, a ne podebljane mutacije uzrokuju nisku razinu rezistencije. Cons=konsenzus divlji tip.
(prerađeno prema: <https://hivdb.stanford.edu/>)

1.4. Laboratorijske metode za određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Određivanje rezistencije ključno je za prikupljanje informacija koje će pridonijeti odabiru bolje antiretrovirusne terapije koja će omogućiti potpuno potiskivanje virusne replikacije. Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove preporuča se svakoj HIV-om zaraženoj osobi, neovisno o početku liječenja. Promjene u virusnom genomu koje uzrokuju rezistenciju na antiretrovirusne lijekove mogu se detektirati genotipskim, fenotipskim ili testovima virtualnog fenotipa. Klinička dijagnostika rezistencije i biomedicinska istraživanja rezistencije temelje se na rezultatima genotipizacijskih testova. Genotipizacijski testovi detektiraju određene mutacije u genomu HIV-a koje su povezane s nastankom rezistencije na

antiretrovirusne lijekove (37). Genotipizacijski test sastoji se od nekoliko koraka : 1) izolacija HIV-1 RNA iz plazme pacijenta, 2) reverzna transkripcija virusne RNA u DNA 3) amplifikacija ciljne regije (geni za IN, PR i RT) lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*), 4) sekvenciranje slijeda nukleotida u sekvenci amplificiranog produkta po Sangeru (tzv. populacijsko sekvenciranje). Prilikom određivanja rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove, analiziraju se sekvence cijelog gena za integrazu (od kodona 1-288), cijeli gen za proteazu (od kodona 1-99) te 2/3 gena za reverznu transkriptazu (od kodona 1-335). Dobivene sekvence gena za integrazu, reverznu transkriptazu i proteazu prevode se u sekvencu aminokiselina i uspoređuju se sa sekvencom divljeg tipa virusa (genotip B) i analiziraju pomoću različitih algoritama radi utvrđivanja mutacija vezanih za pojedine skupine lijekova te utvrđivanja biološke i kliničke značajnosti tih mutacija. Interpretacija biološke značajnosti mutacija temelji se na primjeni bioinformatičkih algoritama temeljenim na pravilima (engl. "rule-based algorithms"). Računalni algoritmi temeljeni na pravilima (engl. "rule-based" algorithms) klasificiraju virus kao "osjetljiv", "moguće rezistentan" i "rezistentan" (11,38). Algoritmi su dizajnirani od strane referentnih laboratorija, tj. panela ekspertnih znanstvenika i nadopunjuju se novim podacima svakih nekoliko mjeseci. Najpoznatiji su ANRS (Agence Nationale de Recherches sur le SIDA), HIVdb (Stanford University Medical Center, CA, SAD), RegaInst (Rega Institute for Medical Research and University Hospitals Leuven, Katholieke Universiteit Leuven, Belgija) (37).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

(1) Analizirati mutacije povezane s rezistencijom HIV-a tipa 1 na antiretrovirusne lijekove u zaraženih osoba prije započinjanja liječenja i usporediti ih s mutacijama koje se pojavljuju u osoba s virološkim neuspjehom liječenja

(2) Usporediti interpretaciju biološke značajnosti detektiranih mutacija primjenom tri bioinformatička algoritma: Stanford Database Algorithm, ANRS algoritma te REGA algoritma.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici

U istraživanje sam uključio osobe zaražene HIV-om starije od 18 godina koje se liječe u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a Ministarstva zdravstva R. Hrvatske. Osobe koje sam uključio u svoje istraživanje, podijelio sam u dvije skupine. Prvu su činile osobe zaražene HIV-om prije započinjanja liječenja (N), a drugu skupinu osobe s virološkim neuspjehom liječenja (L). Za određivanje rezistencije virusa HIV-a na antiretrovirusne lijekove, nužno je bilo da viremija u plazmi ispitanika iznosi >1000 kopija HIV-1-RNA/mL.

3.2. Biološki uzorci

U istraživanju sam koristio ostatne uzorke iz plazme HIV-om zaraženih osoba prikupljenih za dijagnostičku obradu ispitanika. Uzorci krvi od pacijenata venepunkcijom su prikupljeni u sterilne epruvete s antikoagulansom (K₃EDTA) te je izdvojena plazma centrifugiranjem na 3500 x g, 10 min pri sobnoj temperaturi. Alikvote plazme pohranio sam pri -80°C do testiranja. Uzorke plazme koristio sam za potrebe određivanja rezistencije HIV-a na lijekove iz skupine NRTI, NNRTI, PI i INSTI koristeći metodu populacijskog sekvenciranja *pol* regije genoma HIV-a uz primjenu genotipizacijskog testa ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit i ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Cellera, CA, SAD).

3.3. Komercijalni paketi

Komercijalni paket za određivanje genotipske rezistencije HIV-1 na INSTI

ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD)

Komercijalni paket za određivanje genotipske rezistencije HIV-1 na NRTI, NNRTI i PI

ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera, CA, SAD)

Tablica 1. Popis komercijalnih paketa za određivanje genotipske rezistencija HIV-1

Komercijalni paketi za pripremu uzoraka	Opis
HIV Viral Lysis Buffer	43% Guanidine Thiocyanate <2% Dithiothreitol <0.1% Glycogen <1% N-Lauroylsarcosine <1% Sodium Citrate
RNA Diluent	Poly rA RNA (synthetic) <0.1% EDTA <0.1% Tris-HCl buffer 0.05% Sodium Azide
Komercijalni paketi za RT i PCR	Opis
HIV RT Mix	Tris-KCl buffer <0.1% Magnesium Chloride <0.1% dATP, dCTP, dGTP, dTTP <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers 0.05% Sodium Azide
RNase Inhibitor	20 U/μL RNase Inhibitor 50% Glycerol
MuLV Reverse Transcriptase	50 U/μL Recombinant Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase 50% Glycerol
HIV PCR Mix	Tris-KCl buffer <0.1% Magnesium Chloride <0.1% dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers 0.05% Sodium Azide
AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase	5 U/μL AmpliTaq Gold® DNA Polymerase 50% Glycerol
AmpErase® UNG	1 U/μL Uracil N-glycosylase 5% Glycerol
DTT (100 mM)	100 mM 1.4% Dithiothreitol
DNA Mass Ladder	Tris-EDTA buffer <0.1% DNA mass ladder 0.2% Lauryl Sulfate Sodium 17% Sucrose <0.1% Bromphenol blue
Agarose Gel Loading Buffer	<0.1% Bromphenol blue 40% Sucrose <3.7% EDTA 0.5% Lauryl Sulfate Sodium
RNA Diluent	Poly rA RNA (synthetic) <0.1% EDTA <0.1% Tris-HCl buffer 0.05% Sodium Azide

Komercijalni paketi za sekvenciranje RT i P	Opis
HIV SEQ Mix A	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix B	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix C	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix D	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix F	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix G	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
HIV SEQ Mix H	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers and nucleotides <0.1% AmpliTaq® DNA Polymerase, FS <0.1% Magnesium Chloride
Komercijalni paketi za RT-PCR	Opis
RT-PCR Submic	Tris/KCL/(NH ₄)SO ₄ buffer with DTT and MgCl ₂ <0.1% dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers
RT-PCR Enzyme Mix	Omniscript and Sensiscript Reverse Transcriptases HotStar Taq DNA Polymerase 50% Glycerol
UNG	Uracil-DNA Glycosylase 50% Glycerol
RNase Inhibitor	RNase Inhibitor 50% Glycerol
DNA Mass Ladder	Tris-EDTA buffer <0.1% DNA mass ladder 0.2% Lauryl Sulfate Sodium 17% Sucrose <0.1% Bromphenol blue
Agarose Gel Loading Buffer	<0.1% Bromphenol blue 40% Sucrose <3.7% EDTA 0.5% Lauryl Sulfate Sodium

Komercijalni paketi za sekvenciranje Int	Opis
HIV SEQ Mix A	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers
HIV SEQ Mix B	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers
HIV SEQ Mix C	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers
HIV SEQ Mix D	BigDye® Terminator Ready Reaction Mix <0.1% non-infectious synthetic oligonucleotide HIV-1 primers
Komercijalni paketi za pročišćavanje PCR produkta	Opis
PCR Cleanup Reagent	Exonuclease 1: Recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase Buffer

3.4. Oprema i potrošni materijali

Tablica 2. Oprema i potrošni materijali

Oprema/potrošni materijal	Proizvodač
sekvencer ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, UK
termociklički amplifikator GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, UK
epruvete Vacutainer	Becton Dickinson, SAD
Mikropipete	Thermo Fisher Scientific, SAD
ultracentrifuga SIGMA 3K30	Sigma, Njemačka
nastavci za pipete, RNase-free, 10-100 µL	Herbos dijagnostika, Hrvatska
etanol (96% i 70%)	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
Voda, sterilna i deionizirana, RNase/ DNase-free	
Natrijev acetat (pH 5.2)	Sigma, Njemačka
mikroepruvete od 1.5 i 2mL	Sarstedt, Njemačka
mikroepruvete za PCR	Applied Biosystems, UK
reakcijske tubice i pokrovi za sekvenciranje	Applied Biosystems, UK
Vrtložna miješalica Agitateur Top-Mix 1118	Thermo Fisher Scientific, SAD
izopropanol (100%)	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
centrifuga za mikrotitratske pločice 5430	Eppendorf, Njemačka
podloga, držač i pokrov za pločice od 96 jažica	Applied Biosystems, UK
TAE pufer (50X)	Invitrogen Life Technologies
agaroza	Invitrogen Life Technologies
SYBR Safe DNA boja za elektroforezu	Invitrogen Life Technologies
E-Gel® Low Range Quantitative DNA Ladder	Invitrogen Life Technologies
ExoSAP-IT	Thermo Fisher Scientific, SAD
3100 Performance Optimized Polymer 6 (POP-6™)	Applied Biosystems, UK
10X Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Applied Biosystems, UK
Hi-Di™ Formamid	Applied Biosystems, UK
310 Genetic Analyzer Capillary, 47 cm	Applied Biosystems, UK
BigDye® Terminator v1.1 standard za sekvenciranje	Applied Biosystems, UK

3.5. Metode

3.5.1 Izolacija HIV-1 RNA

Koraci u izolaciji HIV-1 RNA za oba genotipizacijska testa su isti. Uzorke plazme koje su bile pohranjene na -80°C otopio sam na sobnoj temperaturi i miješao na vrtložnoj miješalici. Nakon centrifugiranja 2 s na $2,000 \times g$, pipetirao sam $500 \mu\text{L}$ uzorka u čistu epruvetu bez RNaza/DNaza (eng. *RNase/ DNase-free*) te ponovno stavio uzorke u centrifugu (4°C) na 60 min, $25,000 \times g$. Po završetku centrifugiranja, odvojio sam pipetiranjem supernatant od taloga i dodao u svaku epruvetu s talogom $600 \mu\text{L}$ Viral Lysis pufera te kratko miješao uzorke na vrtložnoj miješalici. Uzorke sam ponovno stavio 2 s u centrifugu na $2,000 \times g$ te odvojio supernatant od taloga. U svaku epruvetu s talogom dodao sam $600 \mu\text{L}$ izopropanola i kratko miješao na vrtložnoj miješalici. Uzorke s izopropanolom centrifugirao sam 15 min na $15,000 \times g$ kako bi se odvojila virusna RNA od ostalih staničnih molekula. Nakon centrifugiranja izdvojio sam talog od supernatanta i dodao 1 mL hladnog (2°C - 8°C) 70% etanola u svaku epruvetu te centrifugirao 5 min na $15,000 \times g$. Nakon ovog koraka, RNA je bila vidljiva kao talog na dnu epruvete. Za uspješnost lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (eng. *RT-PCR*), koja slijedi nakon izolacije RNA, bilo je nužno ukloniti sav etanol iz epruveta. Prema uputama proizvođača za viremiju $> 15,000$ kopija HIV-1 RNA po mL plazme dodao sam u svaku epruvetu $100 \mu\text{L}$ RNA razrjeđivača. Prilikom svih koraka u oba genotipizacijskog testa, koristio sam otopine koje su slobodne od RNaza (*RNase-free*). U proces izolacije RNA nisam uključio pozitivnu i negativnu kontrolu jer ne zahtijevaju izolaciju RNA.

3.5.2. Sekvenciranje gena *pol* HIV-1

Na ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer sekvenceru (Applied Biosystems, UK) sam primjenom dvije skupine različitih reagensa ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD) i ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera, CA, SAD) sekvencirao većinu gena *pol* HIV-1 : cijel gen za integrazu (od kodona 1-288), cijeli gen za proteazu (od kodona 1-99) te 2/3 gena za reverznu transkriptazu (od kodona 1-335) primjenom Sangerove dideoksi-metode. Za razliku od genotipizacijskog testa rezistencije HIV-1 na INSTI, kod kojeg nakon pripreme uzoraka (izolacije RNA) slijedi lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije u jednom koraku (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR*), u genotipizacijskom testu rezistencije HIV-1 na NRTI, NNRTI i PI, taj je korak podijeljen zasebno na reverznu transkripciju nakon koje slijedi lančana reakcija polimerazom. Oba

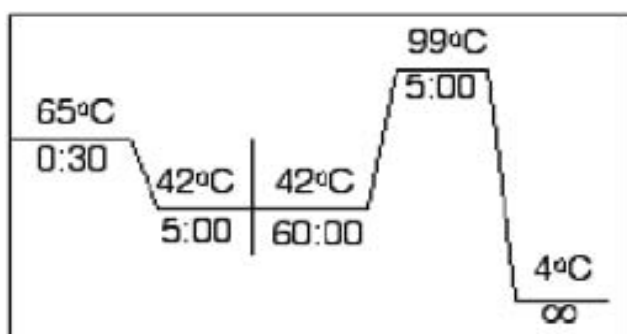
genotipizacijska testa rezistencije HIV-1 temelje se na metodi populacijskog sekvenciranja i sastoje se od nekoliko koraka. Prema uputama proizvođača, nakon izolacije RNA, u eksperiment sam uključio pozitivnu i negativnu kontrolu.

3.5.2.1 Reverzna transkripcija

Iz pripremljenih uzoraka (izolati RNA), ispipetirao sam 10 μ L resuspendirane RNA u MicroAmp® epruvete za PCR te ih zagrijao na 65°C na termocikličkom amplifikatoru (GeneAmp® PCR system 9700) prema uputama proizvođača. Nakon toga dodao sam u svaku epruvetu 10 μ L reakcijske smjese za reverznu transkripciju, koju sam pripremio prema uputama proizvođača (Tablica 3). Epruvete s reakcijskim smjesama sam ponovno stavio u termociklički amplifikator prema uputama proizvođača (Slika 1). Uzorke sam nakon toga pohranio na -20°C ili odmah koristio u PCR reakciji.

Tablica 3. Reakcijska smjesa za reverznu transkripciju

Sastojak	Volumen za 1 reakciju (μ L)
HIV RT Mix	8
RNase Inhibitor	1
MuLv Reverse Transcriptase	1
DTT, 100 mM	0.4
Ukupni volumen	10.4



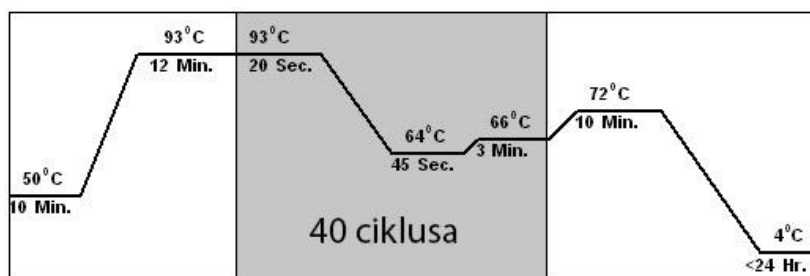
Slika 14. Program u termocikličkom amplifikatoru za reverznu transkripciju (preuzeto od : ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD))

3.5.2.2 Lačana reakcija polimerazom (eng. *polymerase chain reaction, PCR*)

Uzorke cDNA nakon reverzne transkripcije sam koristio u PCR reakciji. U slučaju da sam pohranio uzorke na -20°C, prije započinjanja PCR reakcije, uzorke je trebalo otopiti na sobnoj temperaturi. Primjenom reakcijske smjese za PCR (Tablica 4), u termocikličkom amplifikatoru prema uputama proizvođača umnožio sam dobivenu virusnu cDNA. PCR reakcija sastoji se od nekoliko koraka. U prvom ciklusu (50°C, 10 min.) uracil-DNA-glikozilaza (UNG) uklanja svu DNA nakon reverzne transkripcije koja sadrži ugrađene deoksiuridine. Nakon ovog koraka slijedi inaktivacija UNG, aktivacija AmpliTaq Gold® DNA polimeraze i denaturacija RNA-cDNA hibrida u jednolančane molekule, na 93°C, 12min. Koraci koji slijede su: denaturacija dl DNA, sparivanje početnica i elongacija (Slika 2). Tijekom ovog procesa umnožen je fragment *pol* gena HIV-1 (cijeli gen za proteazu i dio gena za reverznu transkriptazu) i generirani su ampliconi veličine 1,8 kb. Uzorke sam pohranio na 4°C prije početka reakcije sekvenciranja.

Tablica 4. Reakcijska smjesa za lančanu reakciju polimerizacijom

Sastojak	Volumen za 1 reakciju (μL)	Volumen za 5 reakcija (μL)	Volumen za 15 reakcija (μL)
HIV PCR Mix	29,5	147,5	442,5
AmpliTaQ Gold DNA polymerase	0,5	2,5	7,5
AmpErase UNG	1	5	15
Ukupni volumen	31	155	465



Slika 15. Program u termocikličkom amplifikatoru za lančanu reakciju polimerizacijom (prerađeno od: ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD))

3.5.2.3. Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-PCR)

Lančanom reakcijom polimeraze nakon reverzne transkripcije u jednom je koraku reverzno prepisana izolirana HIV-1 RNA te je dobivena cDNA umnožena i generirani su ampliconi veličine 1.1 Kb. Ovim korakom sam umnožio gen za integrazu. Postupak sam proveo prema uputama proizvođača u nekoliko koraka. U svaku PCR mikroeprevetu dodao sam 40 μ L RT-PCR reakcijske smjese (Tablica 5), zajedno s 10 μ L izolirane RNA. Mikroeprevete sam stavio u termociklički amplifikator (GeneAmp® PCR system 9700) prema uputama proizvođača (Tablica 6).

Tablica 5. RT-PCR reakcijska smjesa

Sastojak	Volumen za jednu reakciju (μ L)
RT-PCR Submix	36,0
RT-PCR Enzyme Mix	2,0
UNG	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Ukupni volumen	40,0

Tablica 6. Program za RT-PCR u termocikličkom amplifikatoru

Korak	T(°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
UNG	20	10:00	-
Reverzna transkripcija	55	30:00	-
PCR aktivacija	95	15:00	-
Denaturacija	94	00:15	45
Sparivanje početnica	55	00:30	
Elongacija	68	01:30	
Ekstenzija	68	7:00	-
Kraj	4	-	-

3.5.2.4. Pročišćavanje i kvantifikacija RT-PCR i PCR produkta

Nakon PCR reakcije, svaku reakcijsku smjesu sam pročistio od suviška dNTP-ova i početnica pomoću ExoSAP-IT® komercijalnog paketa za pročišćavanje PCR amplicona (PCR Cleanup Kit, Celera, CA, SAD). Po 5 μ L pročišćenog PCR produkta sam pomiješao s mikrolitrom Gel Loading pufera te ih zajedno sa standardom za određivanje veličine DNA (DNA Mass Laddera) dodao na 1% agarozni gel sa SYBR Safe DNA bojom za elektroforezu. Elektroforezom sam odvojio PCR fragmente na temelju njihove veličine i usporedbom s fragmentima poznatih veličina i koncentracija DNA Mass Laddera, koje sam vizualizirao pod UV svjetlom, odredio njihovu koncentraciju. U skladu s odgovarajućom koncentracijom

uzorke sam razrijedio prema optimalnoj koncentraciji za reakciju sekvenciranja. Ovaj postupak je obrnutog redoslijeda kod produkata RT-PCR reakcije. Uzorci se najprije kvantificiraju elektroforezom te se nakon toga PCR produkt pročišćava primjenom komercijalnog paketa za pročišćavanje PCR amplikona (PCR Cleanup Kit, Celera, CA, SAD) u svrhu uklanjanja suviška dNTP-ova i početnica. PCR reagens Cleanup doda se u svaku mikroeprijetu, miješa na vrtložnoj miješalici te se mikroeprijetu stave u termociklički amplifikator koristeći program naveden od strane proizvođača. Ovisno o masi i koncentraciji, PCR produkt se razrjeđuje prema uputama proizvođača (Slika 16).



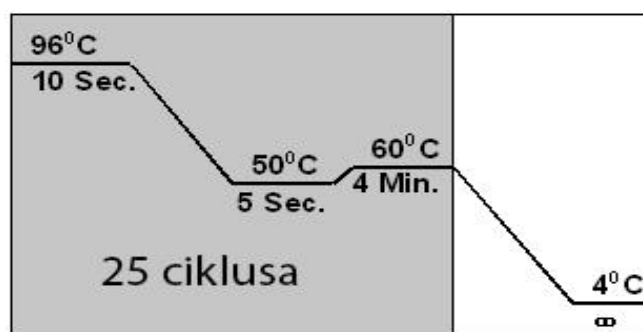
Slika 16. Razrjeđivanje PCR produkta
(prerađeno od: ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD))

3.5.2.5. Reakcija sekvenciranja

U genotipizacijskom testu, za sekvenciranje cijele regije gena za proteazu (kodoni 1-99) i 2/3 gena za reverznu transkriptazu (kodoni 1-335) koristio sam sedam početnica (četiri uzvodne početnice (A, B, C, D) i tri nizvodne (F, G, H)), dok sam za sekvenciranje integraze (ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit) koristio četiri početnice (uzvodna početnica A i B, nizvodna početnica C i D) kako bi dobio maksimalnu pokrivenosti (eng. *coverage*) za ta tri gena. Postupak je u oba genotipizacijska testa isti. Koristeći MicroAmp® pločice sa 96 jažica, u svaki sam stupac dodao drugi uzorak (8 µL pročišćenog i razrijeđenog PCR produkta) te prema uputama proizvođača (Slika 17), u svaku sam jažicu dodao jednu ViroSeq početnicu. Pločice sam stavio u GeneAmp® 9700 termociklički amplifikator prema uputama proizvođača (slika 18). Reakcija sekvenciranja temelji se na Sangerovoj dideoksi-metodi. Nakon reakcije sekvenciranja, uzorke sam odmah koristio u sljedećem koraku.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1-A											S12-A
B	S1-B											S12-B
C	S1-C											S12-C
D	S1-D											S12-D
E	S1-F											S12-F
F	S1-G											S12-G
G	S1-H											S12-H
H	S13-A	S13-B	S13-C	S13-D	S13-E	S13-F	S13-G	S13-H				

Slika 17: S1- uzorak broj 1, A – uzvodna početnica A (preuzeto od ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD))



Slika 18. Program u termocikličkom amplifikatoru za reakciju sekvenciranja (prerađeno od: ViroSeq™ HIV-1 Integrase Genotyping Kit (Celera, CA, SAD))

3.5.2.6. Pročišćavanje sekvenci

Sekvence sam prije analiziranja pročistio od neugrađenih terminatora BigDye® iz reakcije sekvenciranja koristeći metodu s etanolom/natrij acetatom. Po 2 µL 3.0 M natrijevog acetata (pH 5.2) i 50 µL 100% EtOH dodao sam u svaku od reakcija sekvenciranja. Jažice sam prekrrio adhezivnom aluminijskom folijom i miješao na vrtložnoj miješalici. Nakon centrifugiranja, supernatant sam uklonio okretanjem pločica na apsorbirajući papir. U svaku jažicu dodao sam 70% EtOH i ponovi prethodni korak. Sekvence sam analizirao odmah nakon ovog koraka ili sam ih pohranio na -15°C do -20°C u mraku.

3.5.2.7. Detekcija i analiza sekvenci

Pročišćene sekvence otopio sam u formamidu i nanio na Applied Biosystems ABI PRISM® automatizirani DNA sekvencer gdje je detektirana fluorescencija iz četiri boje koje su korištene za identifikaciju A, C, G i T -terminacijskih reakcija. CCD kamera u sekvenceru je detektirala fluorescenciju i pretvorila je u informaciju o sekvenci putem programa za analizu sekvenci. Programom za analizu sekvenci Viroseq, uzeti su podaci od svake početnice te su kombinirane u konsensus sekvencu koja je potom uspoređena s referentnom sekvencom HXB-2 (divlji tip), radi identifikacije virusnih mutacija.

3.5.3. Određivanje rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove

Dobivene sekvence gena za integrazu, reverznu transkriptazu i proteazu HIV-1 bolesnika uspoređene su sa sekvencom divljeg tipa virusa (genotip B) i analizirane pomoću tri algoritma (ANRS, REGA i HIV-DR database) (<https://hivdb.stanford.edu/>) (39), radi utvrđivanja mutacija vezanih za pojedine skupine lijekova te utvrđivanja biološke i kliničke značajnosti tih mutacija. U svom sam istraživanju analizirao rezistenciju HIV-1 na NRTI (abakavir, zidovudin, didanozin, emtricitabin, lamivudin, stravudin, tenofovir), NNRTI (efavirenz, etravirin, nevirapin, rilpivirin), PI (atazanavir, darunavir, fosamprenavir, indinavir, lopinavir, nelfinavir, sakvinavir, tipranavir, ritonavir) i INSTI (raltegravir, elvitegravir i dolutegravir) te je interpretirao prema preporukama The International AIDS Society–USA (ISA-USA) Drug Resistance Mutations Group.

3.5.4. Genotipizacija HIV-1

Subtipove HIV-1 u 40 pacijenata odredio sam analizom sekvenci *pol* gena HIV-1 primjenom bioinformatičkog algoritma Rega HIV-1 subtyping tool version 3.0 (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>) (40). REGA HIV-1 subtyping tool version 3.0 je bioinformatički algoritam pomoću kojeg se određuju subtipovi HIV-1 na temelju analize sekvence dijela *pol* regije genoma virusa, temeljene na kombinaciji filogenetike i rekombinantnim metodama detekcije.

4. REZULTATI

4.1. Ispitanici

U istraživanje sam uključio, u razdoblju od ožujka do kolovoza 2016. godine, 40 HIV-om zaraženih osoba, starijih od 18 godina. Ispitanici su liječeni antiretrovirusnim lijekovima u Referentnom centru za dijagnostiku i liječenje HIV/AIDS-a R. Hrvatske. Ispitanike sam podijelio u dvije skupine prema kriteriju istraživanja. Prvu skupinu su činile osobe prije započinjanja liječenja (n=20), a drugu osobe s neuspjehom liječenja virusa (n=20). Nadalje, u obje skupine ispitanika analizirao sam rezistenciju HIV-1 na NRTI, NNRTI, PI i INSTI. Rezistenciju na NRTI, NNRTI i PI analizirao sam sekvenciranjem gena *pol* HIV-1 (gen za proteazu i reverznu transkriptazu) u 30 pacijenata (19 neliječenih i 11 liječenih), a rezistenciju HIV-1 na INSTI sekvenciranjem *pol* gena HIV-1 (gen za integazu) u 10 pacijenata (1 neliječen i 9 liječenih). Od ukupno 40 pacijenata, 87,5% (35/40) činili su muškarci, a 12,5% (5/40) žene. Medijan dobi ispitanika iznosio je 41,03 (22-66) godina. Podatke o rizičnim čimbenicima ispitanika, prikupio sam u Ambulanti za HIV/AIDS Klinike za infektivne bolesti u Zagrebu. Iz prikupljenih podataka, utvrdio sam da je 28/35 (80%) muških ispitanika imalo spolne odnose s muškarcima (MSM), a ostalih 12 ispitanika (30%), pripada skupini osoba koje su imale heteroseksualne spolne odnose (HETERO) (Tablica 7).

Tablica 7. Parametri ispitanika u istraživanju

Parametar	Ispitanici (n=40)
Dob (godine)	41,03 (22-66)
Spol, broj (%)	
<i>Muškarci</i>	35 (87,5%)
<i>Žene</i>	5 (12,5%)
Liječenje s ARV, broj (%)	
<i>Neliječeni</i>	20 (50%)
<i>Liječeni</i>	20 (50%)
Rizični čimbenik za infekciju	
<i>Muškarci koji imaju spolne odnose s muškarcima</i>	28 (70%)
<i>Osobe koje imaju heteroseksualne spolne odnose (M i Ž)</i>	12 (30%)

4.2. Rezistencija na antiretrovirusne lijekove

Od ukupno 40 sekvenci, sekvenciranjem regije gena *pol* HIV-1, u 37,5% (15/40) utvrdio sam postojanje jedne ili više mutacija, od kojih je 20% (8/40) bilo primarnih mutacija. U 30% (6/20) sekvenci iz skupine neliječenih pacijenata, utvrdio sam postojanje jedne ili više mutacija, od kojih sam u 2/20 (10%) ustanovio postojanje primarnih mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove. U skupini koju su činili ispitanici s virološkim neuspjehom liječenja, 45% (9/20) ispitanika je nosilo jednu ili više mutacija u genomu HIV-1, od kojih je u 6/20 (30%) sekvenci bilo primarnih mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na antiretrovirusne lijekove.

4.2.1. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NRTI

U 23,3% (7/30) svih sekvenci koje su analizirane na rezistenciju HIV-1 na NRTI, utvrdio sam jednu ili više mutacija povezane s postojanjem rezistencije na NRTI. Od ukupno 30 pacijenata, primarne mutacije povezane s postojanjem rezistencije HIV-1 na NRTI imalo je 10,5 % (2/19) neliječenih pacijenata te 36,4% (4/11) liječenih pacijenata. U sekvencama oba neliječena pacijenta utvrdio sam postojanje primarne mutacije T215S/L; supstitucija na poziciji 215 u genu za RT: treonin zamijenjen sa serinom (T215S) i treonin zamijenjen s leucinom (T215L). T215S je primarna mutacija u neliječenih pacijenata. U sekvenci s mutacijom T215L, detektirao sam i primarnu mutaciju povezanu s rezistencijom na timidinske analoge M41L; supstitucija na poziciji 41 u genu za RT: metionin zamijenjen s leucinom.

Kod liječenih pacijenata najučestalija primarna mutacija bila je supstitucija na poziciji 184 u genu za RT: metionin zamijenjen s valinom (M184V) u 18% (2/11) sekvenci i metionin zamijenjen s izoleucinom (M184I) u 9% (1/11) sekvenci. Također sam u sekvenci jednog pacijenta utvrdio postojanje primarne mutacije M41L. Od popratnih mutacija najučestalija je bila supstitucija na poziciji 69 u genu za RT: treonin zamijenjen s alaninom (T69A) u 18% sekvenci (2/11) te treonin zamijenjen s asparginom (T69N) u 9% (1/11) sekvenci. Ostale popratne mutacije koje sam utvrdio kod liječenih pacijenata bile su supstitucije na različitim pozicijama u genu za RT: K70N, L74V, D67G, Y115F, T215S, K219E/R. Tablica 8 pokazuje sve mutacije koje sam dokazao analizom sekvenci, njihov broj te biološku značajnost za rezistenciju HIV-1 na NRTI (Tablica 8).

Tablica 8. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na nukleozidne analoge inhibitore reverzne transkriptaze (NRTI)

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirsne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj neliječenih pacijenata	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj liječenih pacijenata
41	M	L	Primarna mutacija iz skupine TAM-I. M41L obično se javlja u kombinaciji s T215Y te zajedno s njom uzrokuje visoku razinu rezistencije na ZDV i d4T i nisku razinu rezistencije na ddI, ABC i TDF.	1/19	1/11
69	T	N	Ne-polimorfna popratna mutacija. U kombinaciji s mutacijama timidinskih analoga, smanjuje osjetljivost virusa na ZDV, ddI i d4T.	0/19	2/11
69	T	A	Relativno polimorfna mutacija slabo selektirana u pacijenata koji primaju terapiju s NRTI. Slabo istražena mutacija.	0/19	1/11
70	K	N	Rijetka ne-polimorfna mutacija koja uzrokuje nisku razinu rezistencije virusa na TDF, ABC, ddI te vjerojatno na 3TC i FTC.	0/19	1/11
74	L	V	Mutacija koja uzrokuje visoku razinu rezistencije virusa na ddI i umjerenu razinu rezistencije na ABC.	0/19	2/11
67	D	G	Ne-polimorfna popratna mutacija iz skupine TIM-II, povezana s niskom razinom rezistencije na ZDV i d4T.	0/19	1/11
115	Y	F	Y115F uzrokuje umjerenu razinu rezistencije virusa na ABC i nisku razinu rezistencije na TDF. U kombinaciji s K65R ili Q151M, Y115F značajno smanjuje osjetljivost virusa na ABC i TDF.	0/19	1/11
			Primarna mutacija koja nastaje mehanizmom diskriminacije. Uzrokuje visoku razinu <i>in vitro</i> rezistencije virusa na 3TC i		

184	M	V/I	FTC te nisku razinu rezistencije na d4T i ABC. M184V/I je povezana s povećanom osjetljivošću virusa na ZDV, TDF i d4T te samim time klinički značajno smanjenom stopom replikacije HIV-1.	0/19	3/11
215	T	S/L	Popratne "revertantne" mutacije nepoznate kliničke značajnosti. Pojavljuju se u bolesnika koji su zaraženi sojevima s mutacijom T215Y/F, posebno nakon prekida liječenja. Ne utječu na osjetljivost virusa na NRTI. **	2/19	1/11
219	K	E	Sporedna mutacija timidinskih analoga, povezana sa smanjenom osjetljivošću virusa na ZDV te vjerojatno na d4T.	0/19	1/11
219	K	R	Sporedna mutacija timidinskih analoga koja se pojavljuje najčešće u kombinaciji s ostalim mutacijama timidinskih analoga.	0/19	1/11

RT-reverzna transkriptaza

NRTI-nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze;

ABC-abakavir, ZDV- zidovudin, ddI-didanozin, d4T-stavudin, FTC-emtricitabin, TDF-tenofovir, 3TC-lamivudin

*preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Database (39)

** T215S-primarna mutacija kod neliječenih pacijenata (42)

4.2.2. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NNRTI

Od ukupno 30 sekvenci kod kojih sam analizirao rezistenciju HIV-1 na NNRTI, 6 sekvenci (20%) je sadržavalo jednu ili više mutacija povezanih s rezistencijom HIV-1 na NNRTI. Od šest pacijenata, četiri su bila liječena, a dva neliječena pacijenta. U sekvencama svih šest pacijenata utvrdio sam postojanje sekundarne mutacije (V90I); supstitucija u genu za RT na poziciji 90: valin zamijenjen izoleucinom. Kod sekvence jednog liječenog pacijenta utvrdio sam postojanje jedne primarne mutacije koja uzrokuje rezistenciju HIV-1 na NNRTI (G190A); supstitucija na poziciji 190 u genu za RT: glicin zamijenjen alaninom. Također, u sekvenci jednog liječenog pacijenta utvrdio sam još jednu dodatnu sekundarnu mutaciju (V106I); supstitucija na poziciji 106 u genu za RT: valin zamijenjen s izoleucinom. Tablica 9 pokazuje

sve mutacije koje sam dokazao analizom sekvenci, njihov broj te biološku značajnost za rezistenciju na NNRTI (Tablica 9).

Tablica 9. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NNRTI

Pozicija u genu za RT	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj neliječenih pacijenata	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj liječenih pacijenata
90	V	I	Sporedna polimorfna mutacija koja se ovisno o podtipu HIV-1 pojavljuje kod 0,2%-6% neliječenih pacijenata. Ukoliko ne postoje dodatne mutacije, gotovo da ne utječe na osjetljivost virusa na NNRTI.	2/19	4/11
106	V	I	Sporedna polimorfna mutacija koja ukoliko je u kombinaciji s V179D, može uzrokovati nisku razinu rezistencije HIV-1 na NVP, EFV i ETR.	0/19	1/11
190	G	A	Primarna mutacija. G190S uzrokuje visoku razinu rezistencije na NVP i EFV. Sinergistički djeluje s Y181C na smanjenje osjetljivosti na ETR.	0/19	1/11

RT-reverzna transkriptaza

NNRTI-nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze;

EFV-efavirenz, ETR-etravirin, NVP-nevirapin

*preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Database (39)

4.2.3. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na PI

Primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na PI nisam dokazao niti u jednoj sekvenci od ukupnog broja analiziranih (n=30). Najčešća sekundarna mutacija bila je supstitucija u kojoj je leucin zamijenjen s izoleucinom/valinom na poziciji 10 u genu za proteazu (4/30). To je ujedno bila i najčešća mutacija kod neliječenih pacijenata (3/4) (Tablica 10).

Tablica 10. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na inhibitore proteaze (PI)

Pozicija u genu za PR	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirsne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj neliječenih pacijenata	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj liječenih pacijenata
10	L	I/V	Sporedna polimorfna mutacija koja ili smanjuje osjetljivost virusa na PI ili povećava replikativnu sposobnost virusa koji nosi mutacije s rezistencijom na PI.	3/19	1/11
20	K	T	Sporedna ne-polimorfna mutacija, asocirana sa smanjenom osjetljivošću virusa na sve PI, osim DRV i TPV.	0/19	1/11
71	A	T	Česta sporedna polimorfna mutacija koja povećava replikaciju virusa i/ili smanjuje osjetljivost virusa na PI koji nosi ostale mutacije.	1/19	1/11

PR-proteaza

PI-inhibitori proteaze;

DRV-darunavir, TPV-tipranavir

*preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Database (39)

4.2.4. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na INSTI

U 2 od 9 (22%) liječenih pacijenata kod kojih sam analizirao rezistenciju, utvrdio sam postojanje dvije primarne mutacije povezanih s rezistencijom HIV-1 na INSTI. U jednog liječenog pacijenta detektirao sam postojanje supstitucije na poziciji 148 u genu za integrazu u kojoj je glutamin zamijenjen s argininom (Q148R). Ova mutacija karakteristična je za podtip B HIV-1, kod kojeg se pojavljuje zajedno s kompenzacijskom mutacijom G140S. Druga mutacija čije sam postojanje detektirao kod jednog liječenog pacijenta je supstitucija arginina s histidinom na poziciji 155 u genu za integrazu (N155H)(Tablica 11).

Tablica 11. Mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na inhibitore integraze (INSTI)

Pozicija u genu za In	Aminokiselina u divljem tipu	Aminokiselina u mutiranom soju	Biološka značajnost mutacije za rezistenciju na antiretrovirusne lijekove*	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj neliječenih pacijenata	Broj uzoraka s određenom mutacijom/broj liječenih pacijenata
148	Q	R	Ne-polimorfna mutacija prisutna kod pacijenata koji su na terapiji s RAL i EVG. Smanjuje osjetljivost virusa na RAL i EVG 30-100 puta. Zasebno ne utječe na osjetljivost virusa na DTG, dok u kombinaciji s E138K/A/T ili G140S/A smanjuje osjetljivost virusa na DTG za 10 puta.	0/1	1/9
155	N	H	Ne-polimorfna mutacija prisutna kod pacijenata koji su na terapiji s RAL i EVG. Smanjuje osjetljivost virusa na RAL >10 puta, a na EVG >30 puta. Povezana je s virološkim neuspjehom liječenja kod terapije s DTG te nastankom drugih mutacija povezanih s rezistencijom na INSTI.	0/1	1/9

In-integraza

INSTI-inhibitori integraze (eng. *integrase strand transfer inhibitors*);

RAL-raltegravir, EVG-elvitegravir, DTG-dolutegravir

*preuzeto od Stanford HIV Drug Resistance Database (39)

4.3. Interpretacija rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove prema ViroSeq programskoj podršci.

Analizirao sam sekvence *pol* regije gena HIV-om zaraženih osoba kod kojih je zabilježen virološki neuspjeh liječenja i osoba zaraženih HIV-om prije započinjanja ARV terapije te interpretirao biološku i kliničku značajnost pojedinih mutacija na rezistenciju na antiretrovirusne lijekove, koje sam utvrdio primjenom ViroSeq programske podrške. Uzorci su u programskoj podršci ovisno o postojanju rezistencije bili označeni kao: R (rezistencija) i MR (moguća rezistencija) (Tablica 12).

Tablica 12. Učestalost rezistencije HIV-1 na pojedine ARV lijekove

ARV lijekovi	Neliječeni pacijenti (broj uzoraka s rezistencijom na lijeak / ukupni broj analiziranih uzoraka)		Liječeni pacijenti (broj uzoraka s rezistencijom na lijeak / ukupni broj analiziranih uzoraka)	
	R	MR	R	MR
NRTI				
FTC	0/19	0/19	3/11	0/11
3TC	0/19	0/19	3/11	0/11
ZDV	0/19	2/19	0/11	2/11
ddI	0/19	0/19	2/11	1/11
TDF	0/19	1/19	0/11	1/11
d4T	0/19	2/19	0/11	2/11
ABC	0/19	0/19	2/11	1/11
NNRTI				
RPV	0/19	0/19	0/11	0/11
EFV	0/19	0/19	0/11	1/11
ETR	0/19	0/19	0/11	0/11
NVP	0/19	0/19	0/11	0/11
PI				
TPV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
IDV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
SQV/r	0/19	0/19	0/11	0/11

LPV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
DRV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
ATV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
FPV/r	0/19	0/19	0/11	0/11
INSTI				
RAL	0/1	0/1	2/9	0/9
EVG	0/1	0/1	2/9	0/9
DTG	0/1	0/1	0/9	1/9

R-uzorci s rezistencijom; MR-uzorci s mogućom rezistencijom

NRTI-nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI-nenukleozidni

inhibitori reverzne transkriptaze; PI-inhibitori proteaze; INSTI-inhibitori integraze

ABC-abakavir, APV-amprenavir, ATV-atazanavir, ddI-didanozin,

DLV-delavirdin, DRV-darunavir, DTG-dolutegravir d4T-stavudin, EFG-elvitegravir, EFV-efavirenz, ETR-etravirin,

FPV-fosamprenavir, FTC-emtricitabin, IDV-indinavir, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, NVP-nevirapin, RAL-raltegravir

RPV-rilpivirin, SQV-sakvinavir, TDF-tenofovir, TPV-tipranavir, ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin, i /r-lijek kombiniran s ritonavirom

4.4. Interpretacija i usporedba genotipske rezistencije HIV-1 prema algoritmima ANRS, Stanford HIVdb i Rega

Za analizu svake sekvence koristio sam program za usporedbu interpretacije rezultata rezistencije prema tri algoritma na internetskoj stranici Stanford HIVdb. Kod interpretaciji rezultata primijenjene su tri razine rezistencije: "S" (engl. *"susceptible"*), "R" (engl. *"resistant"*) i "I" (engl. *"intermediate"*). Budući da HIVdb dodjeljuje pet razina rezistencije, radi moguće usporedbe s ostala dva algoritma, razine "osjetljiv" i "moguća razina rezistencije" smatrane su razinom "S", "niska razina rezistencije" i "srednja razina rezistencije" smatrane su razinom "I", a "visoka razina rezistencije" smatrana je razinom "R". Kliničku i biološku značajnost mutacija povezanih s rezistencijom na HIV-1 interpretirao sam zasebno za svaku skupinu ispitanika primjenom tri bioinformatička algoritma (Tablica 13 i Tablica 14).

Tablica 13. Interpretacija kliničke i biološke značajnosti mutacija u neliječeni pacijenata povezanih s rezistencijom HIV-1 na NRTI, NNRTI i PI (n=19) te INSTI (n=1) primjenom tri bioinformatička algoritma (ANRS, HIVdb, Rega)

ARV lijeak	Algoritam ANRS			Algoritam HIVdb			Algoritam Rega		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
NRTI									
FTC	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
3TC	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
ZDV	2(10,5%)	0(0%)	17(89,5%)	0(0%)	2(10,5%)	17(89,5%)	0(0%)	2(10,5%)	17(89,5%)
ddI	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	1(5,3%)	18(94,7%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
TDF	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	1(5,3%)	18(94,7%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
d4T	2(10,5%)	0(0%)	17(89,5%)	0(0%)	2(10,5%)	17(89,5%)	0(0%)	2(10,5%)	17(89,5%)
ABC	0(0%)	1(5,3%)	18(94,7%)	0(0%)	1(5,3%)	18(94,7%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
NNRTI									
RPV	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
EFV	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
ETR	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
NVP	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
PI									
TPV/r	3(15,8%)	2(10,5%)	14(73,7%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
IDV/r	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
SQV/r	0(0%)	2(10,5%)	17(89,5%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
LPV/r	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
DRV/r	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
ATV/r	0(0%)	1(5,3%)	18(94,7%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
FPV/r	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)	0(0%)	0(0%)	19(100%)
INSTI									
RAL	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
EVG	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)
DTG	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)	0(0%)	0(0%)	1(100%)

NRTI-nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI-nenuklozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI-inhibitori proteazeABC-abakavir, ATV-atazanavir, ddI-didanozin, DRV-darunavir, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, ETRetravirin, FPV-fosamprenavir, FTC-emtricitabin, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, NVP-nevirapin, SQV-sakvinavir, TDF-tenofovir, TPV-tipranavir, ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin, i /r-lijeakkombiniran s ritonaviroom.. Razina rezistencije: R-rezistentan; I-srednja razina rezistencije; S-osjetlji

Tablica 14. Interpretacija kliničke i biološke značajnosti mutacija u liječenih pacijenata povezanih s rezistencijom HIV-1 na NRTI, NNRTI i PI (n=11) te INSTI (n=9) primjenom tri bioinformatička algoritma (ANRS, HIVdb, Rega)

ARV liječnik	Algoritam ANRS			Algoritam HIVdb			Algoritam Rega		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
vNRTI									
FTC	3(27,3%)	0(0%)	8(73%)	3(27,3%)	0(0%)	8(73%)	3(27,3%)	1(9,1%)	7(63,6%)
3TC	3(27,3%)	0(0%)	8(73%)	3(27,3%)	0(0%)	8(73%)	3(27,3%)	1(9,1%)	7(63,6%)
ZDV	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)	0(0%)	2(18,2%)	9(81,8%)	0(0%)	2(18,2%)	9(81,8%)
ddI	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)	1(9,1%)	2(18,2%)	8(73%)	3(27,3%)	0(0%)	8(73%)
TDF	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	1(9,1%)	10(90,9%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
d4T	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)	0(0%)	2(18,2%)	9(81,8%)	0(0%)	2(18,2%)	9(81,8%)
ABC	1(9,1%)	2(18,2%)	8(72,7%)	1(9,1%)	3(27,3%)	7(63,6%)	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)
NNRTI									
RPV	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)	2(18,2%)	0(0%)	9(81,8%)	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)
EFV	2(18,2%)	0(0%)	9(81,8%)	0(0%)	2(18,2%)	9(81,8%)	2(18,2%)	1(9,1%)	8(73%)
ETR	2(18,2%)	1(9,1%)	8(72,7%)	0(0%)	1(9,1%)	10(90,9%)	0(0%)	1(9,1%)	10(90,9%)
NVP	2(18,2%)	0(0%)	9(81,8%)	2(18,2%)	0(0%)	9(81,8%)	2(18,2%)	0(0%)	9(90,9%)
PI									
TPV/r	1(9,1%)	0(0%)	10(90,9%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
IDV/r	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
SQV/r	0(0%)	1(9,1%)	10(90,9%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
LPV/r	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
DRV/r	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
ATV/r	0(0%)	1(9,1%)	10(90,9%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
FPV/r	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)	0(0%)	0(0%)	11(100%)
INSTI									
RAL	2(22,2%)	0(0%)	7(77,8%)	2(22,2%)	1(11,1%)	6(66,7%)	2(22,2%)	0(0%)	7(77,8%)
EVG	2(22,2%)	0(0%)	7(77,8%)	2(22,2%)	1(11,1%)	6(66,7%)	2(22,2%)	0(0%)	7(77,8%)
DTG	0(0%)	0(0%)	9(100%)	0(0%)	1(11,1%)	8(88,9%)	0(0%)	0(0%)	9(100%)

NRTI-nukleozidni i nukleotidni inhibitori reverzne transkriptaze; NNRTI-nenukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze; PI-inhibitori proteaze. ABC-abakavir, ATV-atazanavir, ddI-didanozin, DRV-darunavir, d4T-stavudin, EFV-efavirenz, ETRetravirin, FPV-fosamprenavir, FTC-emtricitabin, LPV-lopinavir, NFV-nelfinavir, NVP-nevirapin, SQV-sakvinavir, TDF-tenofovir, TPV-tipranavir, ZDV-zidovudin, 3TC-lamivudin, i /r-liječnik kombiniran s ritonaviro. Razina rezistencije: R-rezistentan; I-srednja razina rezistencije; S-osjetljiv

4.5. Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom tri bioinformatička algoritma

Rezultati su smatrani sukladnim ako je istoj sekvenci svaki algoritam dodijelio istu razinu rezistencije za određeni lijek. Potpuna nesukladnost interpretacije rezultata algoritama odnosila se na slučaj kad je istoj sekvenci jedan algoritam dodijelio razinu "S", a drugi razinu "R" za određeni lijek. Interpretacije algoritama smatrane su djelomično nesukladnim ako je istoj sekvenci istovremeno dodijeljena i "S" i "I" ili "R" i "I" razina rezistencije za određeni lijek. Usporedbom podudarnosti interpretacije rezultata analize rezistencije primjenom bioinformatičkih algoritama HIVdb, ANRS, Rega, utvrdio sam:

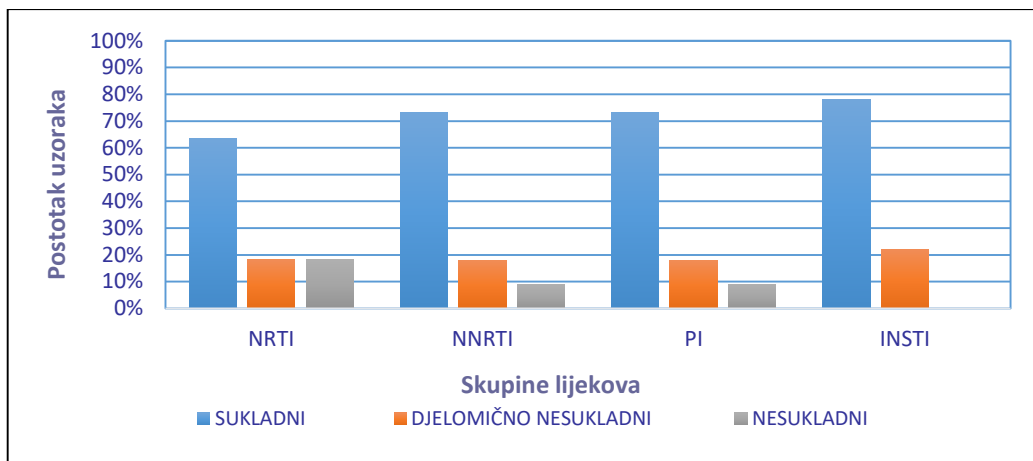
- a) potpunu sukladnost za svih 21 lijekova iz skupina NRTI, NNRTI, PI i INSTI u 60% (24/40) uzoraka, djelomičnu nesukladnost u 22,5% (9/40) uzoraka te u 17,5% (7/40) uzoraka potpunu nesukladnost
- b) potpunu sukladnost za svih 21 lijekova iz skupina NRTI, NNRTI, PI i INSTI u 55% (11/20) uzoraka, djelomičnu sukladnost u 25% (5/20) uzoraka te u 20% (4/20) uzoraka potpunu nesukladnost kod liječenih pacijenata
- c) potpunu sukladnost za svih 21 lijekova iz skupina NRTI, NNRTI, PI i INSTI u 65% (13/20) uzoraka, djelomičnu sukladnost u 20% (4/20) uzoraka te u 15% (3/20) uzoraka potpunu nesukladnost kod neliječenih pacijenata

4.5.1. Analiza sukladnosti interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-1 prema skupini antiretrovirusnih lijekova primjenom tri bioinformatička algoritma

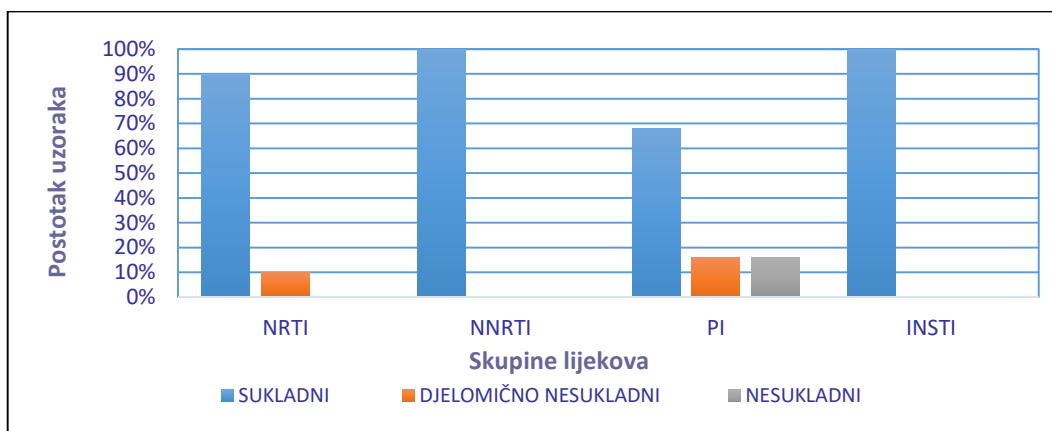
Analiza interpretacije sukladnosti rezultata u liječenih pacijenata pokazala je najveću podudarnost kod INSTI skupine lijekova (77,8% uzoraka je bilo sukladno, 22,2% uzoraka djelomično nesukladno te niti jedan nesukladan uzorak). Algoritmi su dali jednake rezultate sukladnosti u liječenih pacijenata kod NNRTI i PI (72,8% uzorka je bilo sukladno, 18,2% uzoraka djelomično nesukladno te 9% uzoraka nesukladno). Najmanja sukladnost je zabilježena kod NRTI skupine lijekova (63,6% uzoraka je bilo sukladno, 18,2% djelomično nesukladnih te 18,2% uzoraka nesukladno) (Slika 19).

Kod neliječenih pacijenata analizom sukladnosti rezultata, zabilježena je najveća podudarnost kod NNRTI i INSTI skupine lijekova (100% sukladnih uzoraka). Visoka podudarnost zabilježena je i kod NRTI skupine lijekova (89,5% sukladnih rezultata i 10,5% djelomično nesukladnih). Najveća nesukladnost pri interpretaciji rezultata u neliječenih pacijenata zabilježena je kod PI (15,8%), čiji je uzrok bila nesukladnost u interpretaciji algoritama na

TPV/r. Kod ove skupine lijekova zabilježen je i najmanji postotak sukladnih uzoraka (68,4%), te visok postotak djelomično sukladnih rezultata (15,8%) (Sika 20).



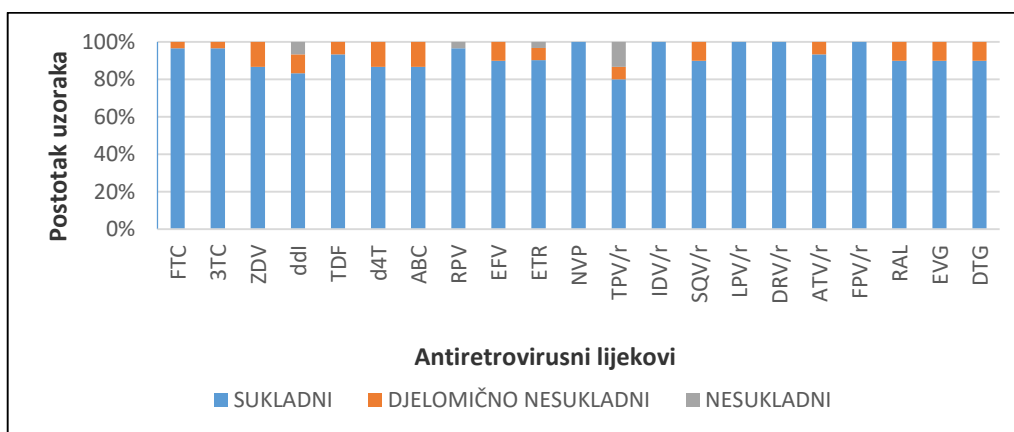
Slika 19. Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u liječenih pacijenata primjenom tri algoritma (ANRS, HIVdb i Rega) prema skupini lijekova.



Slika 20. Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u neličenih pacijenata primjenom tri algoritma (ANRS, HIVdb i Rega) prema skupini lijekova

4.5.2 Analiza sukladnosti interpretacije rezultata rezistencije HIV-1 za pojedinačne antiretrovirusne lijekove prema tri bioinformatička algoritma

Tri algoritma pokazala su u 100% uzoraka sukladnost interpretacije rezultata na dva lijeka (NVP i DRV/r). Najmanje sukladnosti je zabilježeno u uzorcima pri analizi rezistencije na ddI (83,3%) i TPV/r (80%). Najveći broj djelomično nesukladnih rezultata detektiran je pri analizi rezistencije na ZDV, d4T i ABC (13,3%). Pri analizi rezistencije na INSTI, sva tri lijeka su interpretirana sa jednakim postotkom sukladnosti (90% sukladnosti i 10% djelomične sukladnosti). Najčešći uzrok nesukladnosti kod interpretacije rezultata na NRTI bila je rezistencija na ddI. U dva uzorka algoritam Rega interpretirao je rezultat testa kao rezistentan ("R") dok su ga ostala dva algoritma interpretirala kao osjetljiv ("S") te u tri uzorka gdje je algoritam HIVdb detektirao djelomičnu razinu rezistencije na ddI ("I"), a ostala dva algoritma nisu zabilježili postojanje rezistencije ("S"). U tri slučaja algoritmi HIVdb i Rega, interpretirali su rezultat testa kao djelomično rezistentan ("I") na ZDV i d4T, dok je ANRS pokazao rezistenciju na lijek. Isto tako, u tri slučaja algoritmi HIVdb i ANRS ukazali su na postojanje djelomične rezistencije ("I") na ABC, dok ih je algoritam Rega interpretirao kao osjetljivim ("S") na ABC. Najveći broj nesukladnih rezultata (4/7) odnosio se na interpretaciju algoritma na TPV/r. ANRS je pokazao rezistenciju ("R") u 4 sekvence, dok ostala dva algoritma nisu detektirali postojanje rezistencije ("S"). Ostale nesukladnosti odnosile su se na RPV i ETR u jednoj sekvenci, u kojoj je HIVdb interpretirao rezultat testa rezistentnim na RPV, dok ostala dva algoritma nisu zabilježili postojanje rezistencije. Istoj je sekvenci ANRS dodijelio razinu ("R") na ETR, a ostala dva algoritma razinu ("S"). Djelomične nesukladnosti kod interpretacije rezultata testa na INSTI, odnosile su se na sekvence kojima je algoritam HIVdb dao razinu ("I"), a ostala dva algoritma ("S") za EVG (n=1), RAL (n=1) i DTG (n=1) (Slika 21).



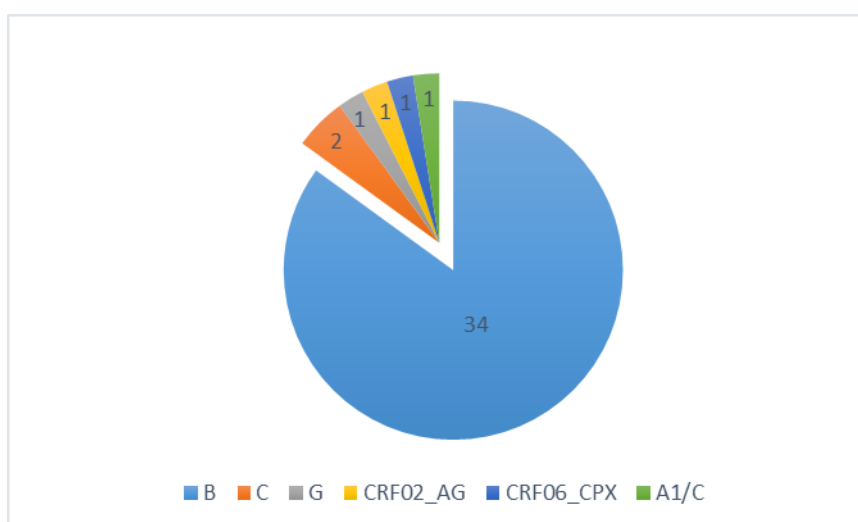
Slika 21. Sukladnost interpretacije rezultata analize rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove primjenom tri algoritma (ANRS, HIVdb i Rega) za svaki lijek

4.5.3 Analiza nesukladnosti rezultata testova rezistencije prema podtipu HIV-a

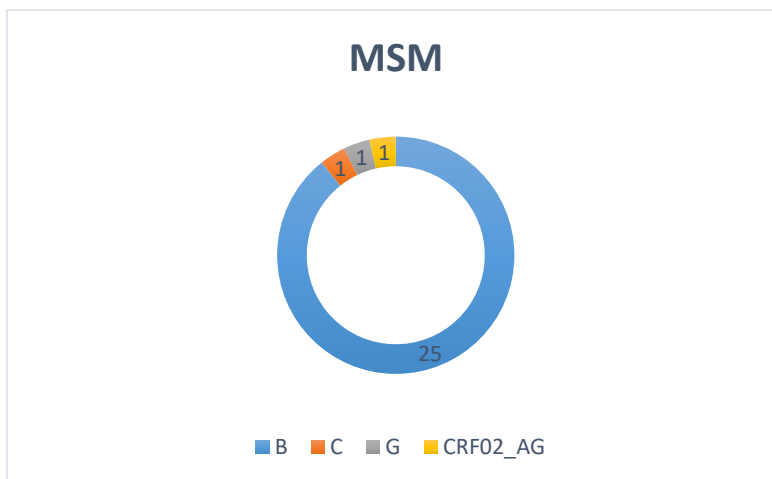
Ukupno 4 od 7 (57%) potpuno nesukladnih sekvenci pripadale su non-B-podtipovima, dok je ostalih 43% potpuno nesukladnih sekvenci pripadalo B podtipu HIV-1. Zanimljivo je da svega 6/40 (15%) sekvenci pripadalo non-B-podtipovima, dok je ostalih 34/40 (85%) pripadalo B podtipu HIV-1. Kod 4 sekvence koje su pripadale non-B-podtipovima, potpuna nesukladnost se odnosila na interpretaciju rezistencije ANRS algoritma na TPV/r te u jednoj sekvenci djelomična nesukladnost također interpretirana od strane ANRS algoritma. Nije zabilježena niti jedna mutacija u te 4 sekvence koja bi bila povezana s rezistencijom na TPV/r.

4.6 Genotipizacija HIV-1

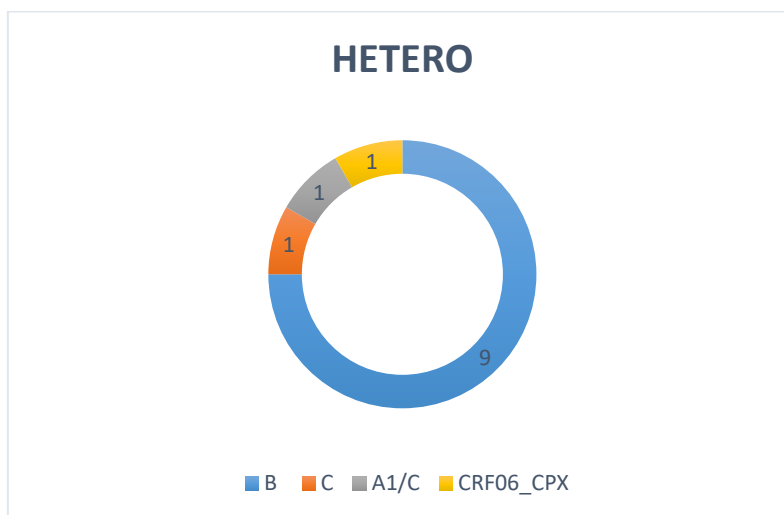
Podtipove HIV-1 u 40 pacijenata odredio sam koristeći bioinformatički algoritam Rega HIV-1 subtyping tool version 3.0. Podtip B HIV-1 detektirao sam u 85% (34/40) sekvenci, dok je 15% (6/40) pacijenata bilo zaraženo non-B-podtipovima grupe M: dvoje ispitanika je bilo zaraženo sa podtipom C, jedan ispitanik sa podtipom G, jedan ispitanik s rekombinantom formom podtipova A1/C te po jedan ispitanik sa cirkulirajućom rekombinantnom formom CRF06_CPX i CRF02_AG (Slika 22). Distribucija genotipova HIV-1 prema rizičnoj skupini prikazana je na slikama 23 i 24. Primjer određivanja podtipova HIV-1 primjenom bioinformatičkog algoritma Rega HIV-1 subtyping tool version 3.0 prikazan se na slikama 25, 26 i 27.



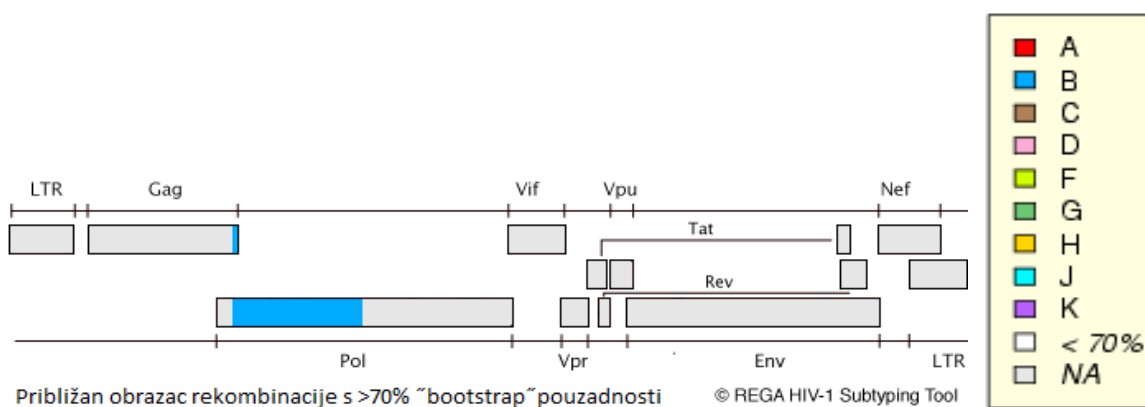
Slika 22. Distribucija genotipova HIV-1 u uzorcima po broju



Slika 23. MSM: B, C, G, CRF02_AG genotipovi HIV-1

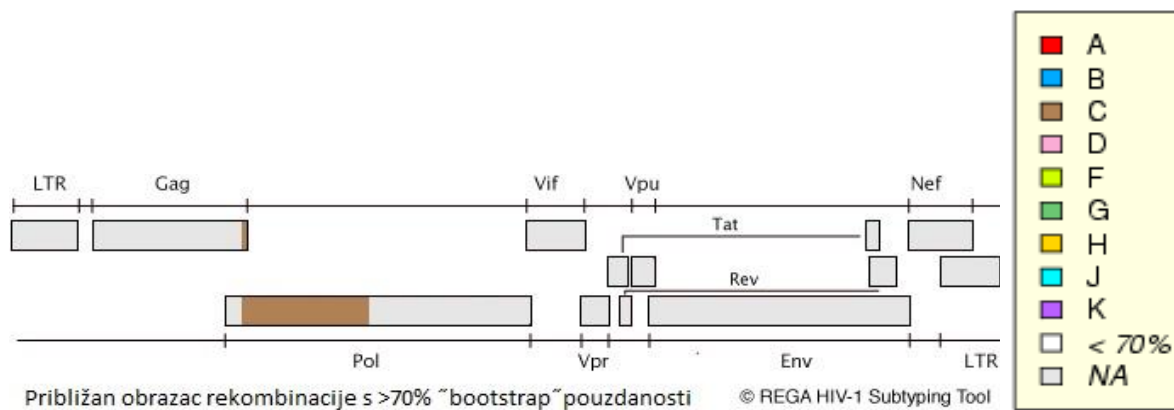


Slika 24. HETERO: B, C, A1/C, CRF06_CPX genotipovi HIV-1

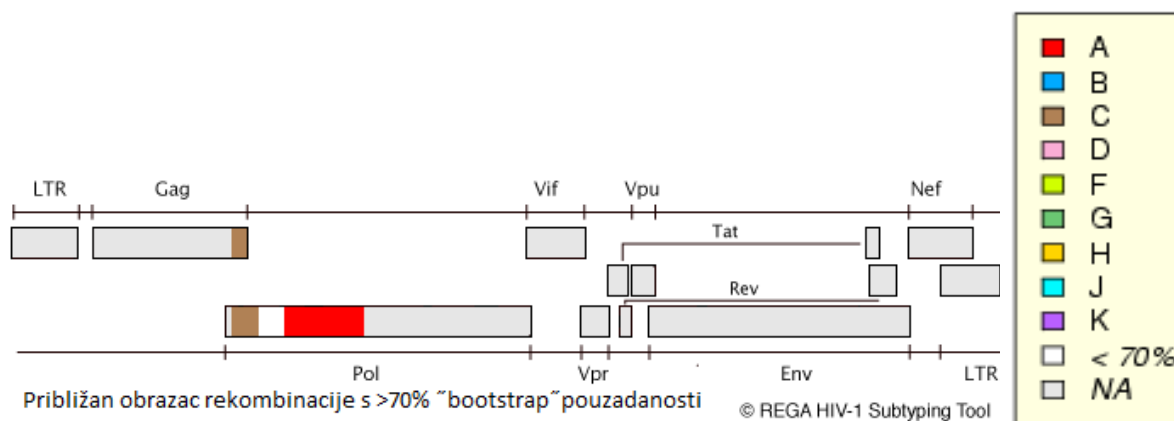


Slika 25. Primjer određivanja podtipa B HIV-a analizom sekvence regije *pol* genoma virusa HIV-1 primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV Subtyping Tool (uzorak CROL11)(preuzeto s:

<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>)



Slika 26. Primjer određivanja podtipa C HIV-a analizom sekvence regije *pol* genoma virusa primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV Subtyping Tool (uzorak CRON15)(prerađeno s: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>)



Slika 27. Primjer određivanja rekombinantnog podtipa A1/C HIV-a analizom sekvence regije *pol* genoma virusa primjenom bioinformatičkog algoritma REGA HIV Subtyping Tool (uzorak CROL20)(prerađeno s: <http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>)

5. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja koje je provedeno tijekom 2016. g. prvi su eksperimentalni dokaz o pojavi rezistencije HIV-a na inhibitore integraze u bolesnika liječenih u Hrvatskoj. Tijekom ovog istraživanja analizirao sam i rezistenciju HIV-1 na još tri skupine antiretrovirusnih lijekova tj. NRTI, NNRTI i PI te usporedio mutacije povezane s rezistencijom u neliječenih zaraženih osoba kao i u prethodno liječenih bolesnika. Uz to, usporedio sam rezultate procjene biološke i kliničke značajnosti otkrivenih mutacija u različitim bioinformatičkim algoritmima.

Rezistencija koja se javlja kod osoba zaraženih s rezistentnim virusom, a koje prethodno nisu bile liječene, naziva se primarna rezistencija. Učestalost primarne rezistencije najčešće je povezana s učestalosti primjene antiretrovirusnih lijekova u određenoj populaciji, rizičnoj skupini ili geografskoj cjelini. Učestalost primarne rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u siromašnim i nerazvijenim zemljama, u kojima je antiretrovirusna terapija slabo dostupna, vrlo je niska.

Sekundarna rezistencija (nastala selektivnim pritiskom lijekova na virus), javlja se ukoliko usprkos antiretrovirusnim lijekovima ne dolazi do potpunog potiskivanja virusne replikacije što se najčešće povezuje s neadekvatnom koncentracijom lijekova uslijed neredovite primjene. Povećanje stope sekundarne rezistencije u određenoj populaciji često prati i povećanje primarne rezistencije (34).

U studiji u sklopu istraživačkog programa SPREAD u kojoj je praćena učestalost primarne rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove u 26 europskih država uključujući i Hrvatsku od 2008. do 2010. godine, pokazala je nisku učestalost primarne rezistencije (8,3%) na antiretrovirusne lijekove iz skupine NRTI, NNRTI i PI (39). U nacionalnom istraživanju *Grgić i sur.* (2012), u kojem je analizirana primarna rezistencija HIV-a na antiretrovirusne lijekove u Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2008. godine, rezultati su bili različiti u odnosu na rezultate istraživanja SPREAD (35,41). Istraživanje *Grgić i sur.* (2012) pokazalo je značajno višu učestalost primarne rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove (NRTI, NNRTI i PI) u Hrvatskoj (čak 22%) u usporedbi sa SPREAD istraživanjem (35). Iznimno visoka učestalost primarne rezistencije na inhibitore reverzne transkriptaze i proteaze u Hrvatskoj u razdoblju od 2006. do 2008.g. autori su povezali s pojavom transmisijskog klastera rezistentnog virusa u populaciji MSM. Literaturni podatci o rezistenciji HIV-a na inhibitore reverzne transkriptaze i

inhibitore proteaze u razdoblju nakon 2008.g. nisu dostupni. Uz to, za sada nema literaturnih podataka o rezistenciji HIV-a na inhibitore integraze u Hrvatskoj.

Primarna rezistencija na antiretrovirusne lijekove u ovom je istraživanju određena prema listi primarnih mutacija iz rada Bennet i sur. (2009) koji su definirali nekoliko kriterija za određivanje mutacija u neliječenih pacijenata (42). Obje mutacije, M41L i T215S, povezane su s primarnom rezistencijom HIV-a na skupinu antiretrovirusnih lijekova NRTI.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima studija *Grgić i sur.* te SPREAD programa, u kojima se većina primarne rezistencije odnosila na NRTI skupinu lijekova (35,39). U studiji *Grgić i sur.* najčešća mutacija povezana s rezistencijom HIV-a na NRTI kod neliječenih zaraženih osoba bila T215S, dok je druga po učestalosti M41L (35). Upravo je M41L primjer kako mutacije koje u liječenih bolesnika ubrajamo u sekundarne, kod neliječenih zaraženih osoba imaju veće biološko značenje, uzrokuju značajnu rezistenciju te se u toj skupini osoba klasificiraju kao primarne mutacije (42).

Mutacija T215S mutacija kod neliječenih zaraženih osoba uzrokuje virološki neuspjeh primjenom „prve linije“ antiretrovirusnih lijekova (engl. *first line regimens*) tj. kombinacija lijekova koje uključuju ZDV ili d4T (39).

M41L je druga mutacija koju sam otkrio u neliječenih HIV-om zaraženih osoba. Ova primarna mutacija iz skupine TAM-I (mutacije timidinskih analoga), utječe na smanjenu osjetljivost virusa na ddI, ABC i TDF. M41 se često pojavljuje s T215Y te osim na prethodno navedene NRTI, uzrokuje i visoku razinu rezistencije na ZDV i d4T (39). U HIV-om zaražene osobe kod koje sam detektirao M41L mutaciju istovremeno sam detektirao i mutaciju T215L koja nije uzrokovala dodatno smanjenje osjetljivosti virusa na NRTI te je klasificirana kao sporedna mutacija.

U ovom istraživanju nisu detektirane primarne mutacije kod neliječenih zaraženih osoba povezane s rezistencijom HIV-1 na lijekove iz skupina INSTI, NNRTI i PI. *Grgić i sur.* (2012) nisu detektirali primarnu rezistenciju na PI, dok je učestalost primarne rezistencije na NNRTI bila niža od učestalosti rezistencije na NRTI (35). Obzirom na to da pod selektivnim pritiskom lijeka dolazi do pojave mutacija u genomu HIV-a i pojave rezistencije (sekundarna rezistencija) na određen lijek ili skupinu lijekova, literaturnih podataka o primarnoj rezistenciji na nedavno odobrenu skupinu lijekova inhibitori integraze, vrlo je malo. Primjena inhibitora integraze raltegravira u Hrvatskoj započela je tek 2015.g.

U studiji koju su proveli Gutiérrez i sur. 2015. godine na 86 neliječenih pacijenata zaraženih B podtipom HIV-1, nisu detektirane primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na INSTI. U pet neliječenih HIV-om zaraženih ispitanika detektirane su neke od

sekundarnih INSTI mutacija (L74V, E138K, G163RS i V151I), koje ne uzrokuju biološki i klinički značajnu rezistenciju HIV-1 na INSTI (43).

Literaturni podatci opisuju nekoliko zaraženih osoba HIV-om s primarnom rezistencijom HIV-1 na INSTI u svijetu.

Young i sur. detektirali su 2011.g. dvije mutacije (Q148H i G140S) u prethodno neliječnog HIV-om zaraženog muškarca i to je prvi opis primarne rezistencije na inhibitore integraze u svijetu (44). Q148H je primarna mutacija koja uzrokuje križnu rezistenciju na RAL i EVG i time značajno smanjuje osjetljivost virusa na ta dva lijeka, dok je G140S sekundarna mutacija koja u kombinaciji s Q148S utječe na smanjenje osjetljivosti virusa na RAL i EVG više od sto puta, a na DTG više od 10 puta.

Boyd i sur. su 2011.g. analizom genoma HIV-1 neliječene HIV-om zaražene žene utvrdili postojanje primarne rezistencije na INSTI te na još tri skupine antiretrovirusnih lijekova (NRTI, NNRTI i PI) (45). U HIV-om zaražene žene detektirana je primarna mutacija N155H koja uzrokuje križnu rezistenciju na RAL i EVG (45).

Do sada u literaturi nije zabilježen niti jedan slučaj primarne rezistencije na DTG. Kod analiziranog neliječnog pacijenta u svom istraživanju, nisam utvrdio niti jednu mutaciju koja bi bila povezana s primarnom rezistencijom na inhibitore integraze.

Pojava sekundarne rezistencije u liječenih bolesnika rezultat je selektivnog pritiska određenog antivirusnog lijeka ili skupine lijekova na virus u kombinaciji s velikom genskom varijabilnosti samog virusa. Obzirom na to da suvremeno antiretrovirusno liječenje uključuje kombinacije od najčešće tri ili četiri antiretrovirusna lijeka, mutacije koje se javljaju kod liječenih pacijenata u korelaciji su s lijekovima korištenim u terapiji. Mogućnost virusa da razvije rezistenciju ovisi o genskoj barijeri (broj mutacija potrebnih za nastanak rezistencije na lijek) samog lijeka. Istraživanje *Planinc A* (2014) od 2008. do 2012. g. pokazalo je izuzetno nisku prevalentnost (5% na sve lijekove, uključujući NRTI, NNRTI i PI) rezistentnosti HIV-a na antiretrovirusne lijekove kod liječenih osoba (11).

U ovom istraživanju detektirao sam primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na NRTI u 6 bolesnika. Najčešća primarna mutacija povezana s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove bila je M184V u genu za RT koja uzrokuje visoku razinu rezistencije na lamivudin (3TC) i emtricitabin (FTC) te nisku razinu rezistencije na abakavir (ABC) i didanozin (d4T) (29). Obzirom na to da kombinacija dva antiretrovirusna lijeka iz skupine NRTI predstavlja okosnicu gotovo svake kombinirane antiretrovirusne terapije, pojava mutacija povezanih s rezistencijom na upravo ovu skupinu lijekova je očekivana.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja *Planinić A* (2014), ali i sa istraživanjem *Pillay i sur.* (2005) koje je provedeno u Ujedinjenom Kraljevstvu i u kojem je dokazano da je najveća učestalost rezistencije HIV-1 na antiretrovirusne lijekove u liječenih bolesnika upravo u skupini NRTI (11,46). U oba opisana istraživanja najčešća mutacija u liječenih bolesnika bila je M184V (11,44). Mutacija M184V često se javlja u kombinaciji sa sekundarnim mutacijama L74V ili K65R koje dodatno smanjuju osjetljivost virusa na NRTI (47).

U ovom istraživanju analizom sekvenci, kod dva liječena bolesnika dokazao sam mutaciju M184V u kombinaciji s L74V. Kombinacija ovih mutacija uzrokuje biološki značajnu rezistenciju na 3TC, FTC, ABC i ddI. U jednog liječenog bolesnika dokazao sam primarnu mutaciju M41L. M41L uobičajena je mutacija za antiretrovirusne lijekove koji su analozi timidina (TAM) te smanjuje osjetljivost virusa na zidovudin (ZDV) i stravudin (d4T). U istog bolesnika dokazao sam i sekundarne mutacije T69A, K70N, K219R koje, zajedeno s primarnom mutacijom M41L, dodatno smanjuju osjetljivost virusa na ZDV i d4T. Rezultati ovog istraživanja podudaraju se s rezultatima vrlo opsežne studije *Mendoza i sur.* (2016) u kojoj je analizirano 717 sekvenci *pol*-gena HIV-1 (47). U tom je istraživanju otkrivena veća prevalencija primarne mutacije M148V kod liječenih pacijenata u odnosu na neliječene zaražene osobe, dok su kod neličenih zaraženih osoba najčešće bile prisutne mutacije T215Y/F i M41L (47).

Analizom sekvenci *pol* gena HIV-1 u 4 liječena bolesnika dokazao sam mutacije povezane s rezistencijom na NNRTI. U sve četiri sekvence detektirao sam sekundarnu mutaciju V90I, a samo u jednoj sekvenci primarnu mutaciju G190A. Ova primarna mutacija uzrokuje visoku razinu rezistencije na nevirapin (NVP) i efavirenz (EFV), a u kombinaciji sa V90I dodatno smanjuje osjetljivost virusa na NNRTI. Bolesnici kod kojih sam u istoj sekvenci detektirao mutacije povezane s rezistencijom na NRTI i NNRT, liječeni su kombinacijom dva lijeka iz skupine NRTI i jednog lijeka iz skupine NNRTI (3TC/FTC/EFV). Obzirom na to da su navedene kombinacije lijekova najčešće primjenjivana kombinacija antiretrovirusnih lijekova u Hrvatskoj kombinirana rezistencija na NRTI i NNRTI u liječenih bolesnika je očekivana.

U ovom istraživanju nisam detektirao primarne mutacije povezane s rezistencijom HIV-1 na inhibitore proteaze. Rezultati ovog istraživanja u skladu su s rezultatima istraživanja *Planinić A* (2014) u kojem nisu detektirane primarne mutacije povezane s rezistencijom na PI mutacija u liječenih bolesnika već isključivo mutacije povezane s rezistencijom na NRTI i NNRTI (11).

Mutacije povezane s biološki i klinički značajnom rezistencijom HIV-a na lijekove iz skupine INSTI dokazao sam u dvoje 2 liječenih bolesnika te utvrdio postojanje primarnih mutacija Q148R i N155H. Ove su mutacije povezane s neuspjehom liječenja virološkim i smanjenom osjetljivosti virusa na INSTI raltegravir i elvitegravir. Budući da se obje mutacije nalaze na mjestima u *pol* genu koja kodiraju za aminokiseline (Q148, N155) u aktivnom mjestu integraze s kojim ulaze u interakciju oba antiretrovirusna lijeka tj. raltegravir i elvitegravir, rezistencija na ove lijekove je križna. RAL i EVG su lijekovi s niskom genskom barijerom za rezistenciju, što znači da je pojava jedne primarne mutacije dovoljna za rezistenciju HIV-1 na ova dva lijeka (33,36).

Antiretrovirusna terapija kojom su liječeni bolesnici s virološkim neuspjehom liječenja u kojih sam analizirao rezistenciju na INSTI, sastojala se od okosnice koja je uključivala dva lijeka iz NRTI skupine lijekova i raltegravira (INSTI). Rezultati ovog istraživanja u kojem sam utvrdio primarne mutacije Q148R i N155H, sukladni su rezultatima QDMRK kliničke studije u kojoj su primarne mutacije detektirane kod pacijenata s virološkim neuspjehom liječenja na terapiji s FTC/TDF (NRTI) + RAL (INSTI) bile Q148R i N155H (25). Programska podrška ViroSeq dodijelila je razinu moguće rezistencije (MR) HIV-a na DTG u sekvenci s primarnom mutacijom Q148H, no rezistencija na DTG se javlja jedno ukoliko postoje barem još dvije značajne mutacije jer je DTG lijek s visokom genskom barijerom za rezistenciju. Naime, u tri kliničke studije (SPRING-2, SINGLE i FLAMINGO) u kojima su prethodno neliječeni bolesnici uzimali dva NRTI (FTC/TDF ili ABC/3TC) + DTG, nakon 48 tjedana liječenja nisu se pojavile mutacije povezane s rezistencijom na DTG. Mutacije povezane s rezistencijom na DTG (R263R/K, V151I/V, T97A) pojavile su se u studiji SAILING kod bolesnika koji su bili prethodno na terapiji s INSTI (najčešće raltegravirom), što potvrđuje činjenicu da se sekundarna rezistencija javlja nakon selektivnog pritiska lijeka na virus. Zanimljivo je da u niti jednoj od studija nije zabilježena primarna mutacija M184V koja se javlja prilikom selekcije na skupinu lijekova NRTI, koji su dani u kombinaciji s DTG. Kod pacijenata koji su prethodno liječeni s INSTI, mutacije koje se javljaju znatno utječu na smanjenje replikacijskog potencijala virusa i aktivnost integraze, a budući da je DTG lijek s visokom genskom barijerom, barem tri takve mutacije su potrebne kako bi se stvorila rezistencija. Što je više mutacija to je i manja replikacijska sposobnost virusa te samim time ne dolazi do pojave dodatnih mutacija koje bi utjecale na skupinu lijekova NRTI (36). Kombinirana terapija DTG/3TC/ABC pokazala se boljom od EFV/TDF/FTC u liječenju prethodno neliječenih pacijenata, zbog nuspojava uzrokovanih s EFV. Kod usporedne terapije u kojoj su korištena

dva NRTI u kombinaciji s DTG ili DRV/r, terapija s DTG se pokazala boljom u supresiji virusne replikacije (25).

Stoga se danas DTG smatra najperspektivnijim lijekom od svih antiretrovirusnih lijekova u liječenju prethodno neliječenih i liječenih HIV-om zaraženih osoba. U usporedbi s pojedinačnim lijekovima ili skupinama lijekova, DTG je superiorniji od svih zbog svojih povoljnih svojstava tj. učinkovitosti i sigurnosti primjene. DTG je bolji i u odnosu na RAL zbog visoke genske barijere za rezistenciju, dok je od EVG superiorniji zbog toga što ne treba dodatno pojačavanje sa kobicistatom za duže djelovanje u organizmu, zbog toga što DTG sporo disocira s integraze (36). Zbog svoje visoke genske barijere za rezistenciju DTG je bolji od svih NNRTI i većine NRTI, dok NRTI s podjednako visokom genskom barijerom za rezistenciju nose nekolicinu teških nuspojava koje nisu zabilježene kod DTG. Iako PI karakterizira najviša genska barijera za rezistenciju od svih antiretrovirusnih lijekova, svi inhibitori proteaza zahtijevaju pojačavanje s ritonavirom ("r") za duže djelovanje u organizmu te ih većina stupa u interakciju sa ostalim lijekovima (ne samo antiretrovirusnim) zbog čega ima se pripisuje toksičnost, što nije zabilježeno kod DTG (24,34,36).

Biološka značajnost pojedinih mutacija regije *pol* genoma virusa za rezistenciju HIV-a na antiretrovirusne lijekove procjenjuje se primjenom bioinformatičkih algoritama. U ovom sam istraživanju usporedio rezultate tri algoritma koji se najčešće koriste u europskim laboratorijima (ANRS, Rega i HIVdb). Usporedba interpretacije biološke značajnosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom primjenom bioinformatičkih algoritama pokazala je nesukladnost u 17,5% uzoraka ukazujući na važnost nastavka istraživanja u ovom području. Najveća nesukladnost kod interpretacije biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom odnosila se na PI skupinu lijekova, točnije sve nesukladnosti u ovoj skupini lijekova odnosile su se na TPV/r. Kod neliječenih pacijenata primijećene su tri potpune nesukladnosti algoritama u interpretaciji biološke značajnosti mutacija i sve su se odnosile na interpretaciju TPV/r. *Vargne i sur.* pokazali su nesukladnosti algoritama u interpretaciji biološke značajnosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom na HIV kod liječenih i neliječenih pacijenata. Utvrdili su da se kod neliječenih pacijenata većina nesukladnosti u interpretaciji biološke značajnosti pojedinih mutacija odnosi pri analizi primarne rezistencije na PI. Nesukladnosti su se odnosile na analizu non-B podtipova HIV-1. Neke mutacije koje uzrokuju visoku razinu rezistencije na PI kod B podtipova HIV-1, u non-B podtipova su prirodne polimorfne varijante koje ne utječu na rezistenciju (48).

U ovom istraživanju, sve četiri nesukladnosti u interpretaciji biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom na TPV/r odnosile su se na non-B podtipove (G, A1/C, CRF

02_AG, CRF06_CPX). Sukladno rezultatima *Vargne i sur.*, u ovom istraživanju najviše je nesukladnosti otkriveno pri analizi mutacija povezanih s rezistencijom u liječenih pacijenata koji su primali lijekove iz skupine NRTI. Usporedbom rezultata rezistencije HIV-1 za pojedinačne antiretrovirusne lijekove prema tri bioinformatička algoritma utvrdio sam da je najviše nesukladnosti kod interpretacije mutacija povezanih na ddI, d4T i ABC, što je u skladu s istraživanja koje su proveli *Sturmera i sur* (49). Najveća sukladnost u interpretaciji biološke značajnosti mutacija kod neličenih pacijenata zabilježena je kod NNRTI skupine lijekova (100%) zbog toga što su to lijekovi s niskom genskom barijerom za rezistenciju kod kojih je potrebna jedna mutacija za razvoj biološki značajne mutacije te su algoritmi u njihovoj interpretaciji najčešće sukladni, no u liječenih bolesnika sukladnost u interpretaciji rezistencije na NNRTI nije toliko visoka.

Budući da sukladnost analize interpretacije biološki značajnih mutacija ovisi o podtipu HIV-1, u ovom sam istraživanju odredio podtipove svih 40 ispitanika koristeći bioinformatički algoritam Rega HIV-1 subtyping tool version 3.0 (40). Podtip B HIV-1 detektirao sam u 85% (34/40) sekvenci, dok je 15% (6/40) pacijenata bilo zaraženo non-B-podtipovima grupe M: dvoje ispitanika je bilo zaraženo sa podtipom C, jedan ispitanik sa podtipom G, jedan ispitanik s rekombinantom formom podtipova A1/C te po jedan ispitanik sa cirkulirajućom rekombinantnom formom CRF06_CPX i CRF02_AG.

Istraživanje *Grgić i sur.* (2012) pokazalo je sličan obrazac raspodjele podtipova u Hrvatskoj kao i moje istraživanje. Prema istraživanju *Grgić i sur.* (2012), u Hrvatskoj je većina infekcija HIV-1 uzrokovana podtipom B (88%), a od non-B podtipova (12%) prevladavaju: podtip A, C, D te CRF02_AG i CRF01_AE. Rezultati tog istraživanja pokazali su da 75,6% ispitanika zaraženih podtipom B pripada MSM rizičnoj skupini, 14,1% HETERO rizičnoj skupini, 1,9% intravenoznim korisnicima opojnih droga (engl. IVDU, *intravenous drug use*), dok za ostale ispitanike nije bilo podataka. Također, podaci tog istraživanja pokazuju da su non-B podtipovima HIV-1 zaražene većinom osobe koje ne spadaju u MSM rizičnu skupinu (35). Slični rezultati objavljeni su u istraživanju *Stanojević i sur.*, koje pokazuje da je svega 29% pacijenata koji pripadaju HETERO rizičnoj skupini zaraženo podtipom B HIV-1 (19). Rezultati mog istraživanja sukladni su s rezultatima istraživanja *Stanojević i sur.* te pokazuju da 73,5% (25/34) zaraženih osoba podtipom B HIV-1 pripada rizičnoj skupini MSM, a 26,5% (9/34) osoba pripada HETERO rizičnoj skupini.

Potrebno je istaknuti da se podatci izneseni u radu *Grgić i sur.* i *Stanojević i sur.* odnose na analizu uzoraka bolesnika kojima je zaraza HIV-om dijagnosticirana u razdoblju od 2006-2008.g. te da su rezultati ovog rada jedini dostupni podatci o molekularne heterogenosti HIV-a

u posljednjih 9 godina (19,35). Uz to, rezultati ovog rada pokazali su da postoji razlika u učestalosti pojedinih mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na NRTI, NNRTI, PI i INSTI u neliječenih HIV-om zaraženih osoba i bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja te da postoji razlika u interpretaciji biološke značajnosti pojedinih mutacija obzirom na primjenu bioinformatičkih algoritama. Zaključujem da je učestalost rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u neliječenih HIV-om zaraženih osoba i bolesnika s virološkim neuspjehom liječenja niska te da je potrebno nastaviti istraživanja u smislu optimizacije primjene pojedinih algoritama za interpretaciju značajnosti otkrivenih mutacija.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Učestalost rezistencije HIV-a na antiretrovirusne lijekove u prethodno neliječenih zaraženih osoba HIV-om kao i u prethodno liječenih bolesnika iz Hrvatske je niska.
- 2) U liječenih bolesnika otkrivene su mutacije N155H i Q148R povezane s rezistencijom HIV-a na inhibitore integraze tj. uzrokuju križnu rezistenciju na raltegravir i elvitegravir.
- 3) Rezistencija HIV-a na inhibitor integraze dolutegravir nije dokazana.
- 4) Analiza učestalosti mutacija HIV-1 povezanih s rezistencijom na pojedine skupine antiretrovirusnih lijekova pokazala je da su najčešće mutacije povezane s rezistencijom na NRTI dok rezistencija na PI nije dokazana.
- 5) Mutacije povezane s biološki značajnom rezistencijom u prethodno neliječenih HIV-om zaraženih osoba kao i u liječenih bolesnika s virusološkim neuspjehom liječenja su različite.
- 6) Najčešće mutacije povezana s primarnom rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove bile su T215S i M41L (rezistencija na NRTI) dok je najčešća mutacija važna za rezistenciju u liječenih bolesnika bila M184V/I (također rezistencija na NRTI).
- 7) Bioinformatički algoritmi koji omogućuju interpretaciju biološke značajnosti mutacija povezanih s rezistencijom HIV-a na antiretrovirusne lijekove iskazuju nesukladnosti, posebice obzirom na genotip virusa.
- 8) Analiza molekularne heterogenosti HIV-a pokazuje da je podtip B najčešći u ispitanika iz skupine MSM te da su u Hrvatskoj zastupljeni podtipovi i rekombinante HIV-a koji su uobičajeni u Africi i Aziji.

7. LITERATURA

1. Magiorkinis G, Angelis K, Mamais I, Katzourakis A, Hatzakis A (2016): The global spread of HIV-1 subtype B epidemic. *Infect. Genet. Evol.* 46:169-179.
2. AJ Pinching (1984): The acquired immune deficiency syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* 56: 1-13.
3. Vahlne A (2009): A historical reflection on the discovery of human retroviruses. *Retrovirology.* 6:40.
4. Daniel CD, Mario R, Richard A K (2009): Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu. Rev. Med.* 60:471–484.
5. Sharp MP, Bailes E, Chaudhuri RR, Rodenburg CM, Santiago MO, Hanh BH (2001): *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 356:867-876.
6. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Chen Y, Wain LV, Liegeois F, Loul S, Ngole EM, Bienvenue Y, Delaporte E, Brookfield JF Y, Sharp PM, Shaw GM, Peeters M, Hahn BH (2006): Chimpanzee Reservoirs of Pandemic and Nonpandemic HIV-1. *Science.* 313:523–526.
7. Foley, BT (2001): An overview of the molecular phylogeny of lentiviruses.
8. Hoffman C, Rockstroh J (2012): HIV 21012/2013. Medizin Fokus Verlag, Hamburg.
9. Janeway Jr. CA, Travers P, Nolan A, Walport M, Shlomchik MJ (2001): *Immunobiology: The immune system in health and disease.* Garland Publishing, New York.
10. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjić D (2010): *Imunologija. Medicinka naklada, Zagreb.*
11. Planinić A (2014): *Mutacije povezane s rezistencijom virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu.*
12. Alkhatib G (2009): The biology of CCR5 i CXCR4 receptor. *Curr Opin HIV AIDS.* 4:96-103.
13. Koning FA, Rij RP, Schuitemaker H (2002): Biological and molecular aspects of HIV-1 coreceptor usage. Theoretical biology and biophysics group. NM LA-UR 03-3564.

14. Luring AS, Andino R (2010): Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathogens*. 6:1-8.
15. Abecasis AB, Vandamme AM, Lemey P (2009): Quantifying differences in the tempo of human immunodeficiency virus type 1 subtype evolution. *J. Virol.* 83:12917–12924.
16. Gianella S, Richman DD (2010): Minority variants of drug-resistant HIV. *J. Infect. Dis.* 202:657–666.
17. Abecasis AB, Lemey P, Vidal N, Oliveir T, Peeters M, Camacho R, Shapiro B, Rambaut A, Vandamme AM (2007): Recombination confounds the early evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1: Subtype G is a circulating recombinant form. *J. Vir.* 81:8543–8551.
18. Abecasis AB, Wensing M J, Paraskevis D, Vercauteren J, Theys K, Vijver DAMC, Albert J, Asjö B, Balotta C, Beshkov D, Camacho R J, Clotet B, De Gascun C, Griskevicius A, Grossman Z, Hamouda O, Horban A, Kolupajeva T, Korn K, Kostrikis LG, Kücherer C, Liitsola K, Linka M, Nielsen C, Otelea D, Paredes R, Poljak M, Stöckl EP, Schmit JC, Sönnernborg A, Stanekova D, Stanojevic M, Struck D, Boucher CAB, Vandamme AM (2013): HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized Epidemics. *Retrovirology*. 10:1-13.
19. Stanojevic M, Alexiev I, Beshkov D, Gökengin D, Mezei M, Minarovits J, Otelea D, Paraschiv S, Poljak M, Lepej SZ, Paraskevis D (2011): HIV-1 molecular epidemiology in the Balkans – a melting pot for high genetic diversity. *AIDS Rev.* 13:3-11.
20. The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS)
(<http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>) (pristup: veljača 2017.)
21. Hrvatski zavod za javno zdravstvo(<http://www.hzjz.hr/novosti/epidemiologija-hiv-infekcije-i-aids-a-u-hrvatskoj-u-2016-godini/>) (pristup 07.01.2017.).
22. Wainberg AM, Han Y-S (2015): Will drug resistance against dolutegravir in initial therapy ever occur? *Front. Pharmacol.* 6:90.
23. Arias LM (2010): Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Res.* 85:210–231.
24. Fantauzzi A, Mezzaroma I (2014): Dolutegravir: clinical efficacy and role in HIV therapy. *Ther. Adv. Chronic. Dis.* 5:164-177.

25. White LK, Raffi F, Miller MD (2014): Resistance analyses of integrase strand transfer inhibitors within phase 3 clinical trials of treatment-naïve patients. *Viruses*. 6:2858-2879.
26. Alcaro S, Alteri C, Artesea A, Ceccherini-Silbersteinb FC, Costa G, Ortuso F, Parrottaa L, Perno CF, Svicher V (2011): Molecular and structural aspects of clinically relevant mutations related to the approved non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Drug. Resist. Updat.* 14:141-149.
27. Aloy B, Tazi I, Bagnis CI, Gauthier M, Janus N, Launay-Vacher V, Deray G, Tourret J (2016): Is tenofovir alafenamide safer than tenofovir disoproxil fumarate for the kidneys? *AIDS Rev.* 18:184-192.
28. Boudou VV, Didierjean J, Isel C, Marquet R (2006): Nucleoside and nucleotide inhibitors of HIV-1 replication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:163–186.
29. Tang MW, Shafer RW (2012): HIV-1 Antiretroviral resistance: Scientific principles and clinical applications. *Drugs*. 72:1-25.
30. Mbisa JL, Martin SA, Cane PA (2011): Patterns of resistance development with integrase inhibitors in HIV. *Infect. Drug. Resist.* 4:65–76.
31. Grandegenett, PD, Pandey KK, Sibes B, Hideki A (2015): Multifaceted of retrovirus integrase. *World. J. Biol. Chem.* 6:83-94.
32. Engelman A, Kessl JJ, Kvaratskhelia M (2013): Allosteric inhibition of HIV-1 integrase activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 17:339–345.
33. Mesplède T, Wainberg MA (2015): Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses*. 7:3703-3718.
34. Paredes R, Bonaventura C (2009): Clinical management of HIV-1 resistance. *Antiviral Res.* 85:245-265
35. Grgic I, Lepej SZ, Lunar MM, Poljak M, Vince A, Vrakela IB, Planinic A, Seme K, Begovac J (2012): The prevalence of transmitted drug resistance in newly diagnosed HIV-infected individuals in Croatia: The role of transmission clusters of men who have sex with men carrying the T215S surveillance drug resistance mutation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 28: 1-9.

36. Wainberg MA, Han Y-S (2015): HIV-1 resistance to dolutegravir: Update and new insights. *J. Vir. Erad.* 1:13–16.
37. Shafer RW, Dupnik K, Winters MA, Eshleman SH (2001): A guide to HIV-1 reverse transcriptase and protease sequencing for drug resistance studies. *HIV Sequence Compendium.* 1-51.
38. Paredes R, Clotet B (2008): HIV drug resistance testing. *European infectious disease.* 52-62.
39. Algoritam Stanford (<https://hivdb.stanford.edu/>) (pristup prosinac 2016.).
40. Algoritam Rega (<http://dbpartners.stanford.edu:8080/RegaSubtyping/stanford>) (pristup prosinac prosinac 2016.).
41. Hofstra LM, Sauvageot N, Albert J, Alexiev I, Garcia F , Struck D, Van de Vijver D , Åsjö B, Beshkov D, Coughlan S, Descamps D, Griskevicius A, Hamouda O, Horban A, Van Kasteren M, Kolupajeva T, Kostrikis L, Liitsola K, Linka M, Mor O, Nielsen C, Otelea D, Paraskevis D , Paredes R, Poljak M, Puchhammer-Stöckl E, Sönnernborg A, Staneková D, Stanojevic M, Van Laethem K, Zazzi M, Lepej SZ, Boucher CAB, Schmit J-C, Wensing AM (2016): Transmission of HIV Drug Resistance and the Predicted Effect on Current First-line Regimens in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 62:655–663.
42. Bennett DE, Camachi RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jorda MR, Schapiro JM, Vandamme A-M, Sandstrom P, Boucher CAB, van de Vijver D, Rhee S-Y, Liu TF, Pillay D, Shafer RW (2009): Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance. *PLoS ONE.* 4: e4724.
43. Gutiérrez C, Hernández-Novoa B, Jesús Pérez-Elías M, Moreno AM, Holguín A, Dronda F, Casado JL, Moreno S (2013): Prevalence of primary resistance mutations to integrase inhibitors in treatment-naïve and experienced patients infected with B and non-B HIV-1 Variants. *HIV Clin. Trials.* 1:10-16.
44. Young B, Fransen S, Greenberg KS, Thomas A, Martens S, St Clair M, Petropoulos CJ, Ha B (2011): Transmission of integrase strand-transfer inhibitor multidrug-resistant HIV-1: case report and response to raltegravir-containing antiretroviral therapy. *Antivir. Ther.* 16:253-256.

45. Boyd SD, Maldarelli F, Sereti I (2011): Transmitted raltegravir resistance in an HIV-1 CRF_AG-infected patient. *Antivir Ther.* 16: 257–261.
46. Pillay D, Green H, Matthias R, Dunn D, Phillips A, Sabin C, Evans B (2005): UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom. *Infect. Dis.* 192:967-973.
47. Mendoza Y, Castillo Mewa J, Martínez AA, Zaldívar Y, Sosa N, Arteaga G (2016): HIV-1 antiretroviral drug resistance mutations in treatment naïve and experienced panamanian subjects: Impact on National Use of EFV-Based Schemes. *PLoS ONE* 11: e0154317.
48. Vergne L, Snoeck J, Aghokeng A, Maes B, Valea D, Delaporte E, Vandamme AM, Peeters M, Van Laethem K (2006): Genotypic drug resistance interpretation algorithms display high levels of discordance when applied to non-B strains from HIV-1 naïve and treated patients. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46:53-62.
49. Sturmer M, Doerr HW, Staszewski S, Preiser W (2003): Comparison of nine resistance interpretation systems for HIV-1 genotyping. *Antivir Ther.* 8:239-244.

8. ŽIVOTOPIS

Obrazovanje

2014.-2017. Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski studij molekularne biologije

2010.-2014. Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek
Preddiplomski studij znanosti o okolišu

2007.-2010. I. Gimnazija u Varaždinu

Iskustvo u struci

Laboratorijska praksa:

Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu pod mentorstvom doc. Dr. sc. Nenada Malenice

Studentski poslovi

Aerolet d.o.o, Zagreb

Hotel Esplanade, Zagreb

Kino Tuškanac, Zagreb

Volonterski rad

Noć biologije, PMF, Zagreb

Osobne i komunikacijske vještine

Materinski jezik: hrvatski Strani jezici: engleski, njemački, španjolski

Digitalna kompetencija

Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint) na svakodnevnoj bazi - Internet(e-mail, google+, društvene mreže), uporaba programa Mendeley, uporaba programskog jezika R